



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona

Efecte de la incorporació de biochar al sòl i estrès abiòtic de contaminants orgànics emergents presents en l'aigua de reg en la producció de biomassa de *Lactuca sativa*

Treball Final de Grau

Enginyeria de Sistemes Biològics

Autor: Marta Nadal Talavera

Tutors: Nuria Cañameras

Josep M. Bayona

Setembre 2015

Resum

En els darrers anys hi ha hagut un increment de la demanda hídrica mentre que l'oferta s'ha mantingut igual o fins i tot, en alguns llocs, ha disminuït. Una possible solució a aquest problema és la utilització d'aigües residuals regenerades, sobretot a regions amb escassetat d'aigua. La principal utilització d'aquesta aigua es dona en agricultura i espais verds. No obstant, les plantes de tractament de regeneració d'aigua convencionals no aconsegueixen eliminar la presència de xenobiòtics, entre ells la presència de contaminants orgànics emergents. Per reduir l'acumulació d'aquests contaminants en el sòl o en el cultiu, quan es rega amb aquestes aigües, s'ha vist que pot ser disminuïda amb l'aplicació de biochars en el sòl.

L'objectiu principal del treball és estudiar si la incorporació de biochar en un sòl permet reduir els possibles efectes de toxicitat, generats per la presència d'un conjunt de contaminants orgànics emergent aplicats amb l'aigua de reg. Això es comprovarà determinant la biomassa produïda, la concentració de clorofil·les i l'estrès oxidatiu que presentin les diferents mostres.

En aquest estudi es van incorporar diferents quantitats de biochar (0, 2,5% i 5%) en unes columnes (botelles de vidre invertides amb la base tallada) que contenien sòl procedent d'un camp agrícola de Viladecans. El cultiu era enciam de tipus Meravella. Aquest material es va sotmetre a 8 regs amb contaminants orgànics emergents (Triclosan, Bisfenol A, Ibuprofè, Cafeïna, Carbamazepina, Tonalida, Àcid clofíbric, Furosemida, Metil dihidrojasmonat, Sulfametazina, Hidroclorur de propranolol, Tris(2-cloroetil)fosfat i 17 α -Etinilestradiol a una concentració final de reg de 15 ng de cada analit per mil·lilitre). Les plantes eren regades diàriament per degoteig amb una dosi de 100 mL amb una aigua addicionada amb solució nutritiva.

L'addició de contaminants orgànics emergents afectà negativament la producció de biomassa i clorofil·les. La incorporació de biochar en el sòl no va contribuir a contrarestar l'efecte de la presència de contaminants emergents. Pel que fa a l'estrès oxidatiu, l'emmagatzematge del material vegetal a -20°C durant 5 mesos no va resultar idoni per a frenar l'activitat de l'enzim catalasa, i per tant, no s'ha detectat estrès. L'avaluació d'aquest mètode indica que quan la concentració de peròxid d'hidrogen es baixa el mètode perd exactitud. La mínima quantitat que es va poder detectar amb certesa raonable és de 2,5 ppm i la mínima quantitat que va poder ser mesurada amb precisió i exactitud és de 8,48 ppm.

Resumen

En los últimos años ha habido un incremento de la demanda hídrica mientras que la oferta se ha mantenido igual o ha llegado a disminuir en algunos sitios. Una posible solución a este problema es la utilización de aguas residuales regeneradas, generalmente en regiones con escasez de agua. La principal utilización de esta agua se da en agricultura y espacios verdes. No obstante, las plantas de tratamiento de regeneración de agua convencionales no consiguen eliminar la presencia de xenobióticos, entre ellos la presencia de contaminantes orgánicos emergentes. Para reducir la acumulación de estos contaminantes en el suelo o en el cultivo, cuando se riega con estas aguas, se ha visto que puede ser disminuida con la aplicación de biochars en el suelo.

El objetivo principal del trabajo es estudiar si la incorporación de biochar en un suelo permite reducir los posibles efectos de toxicidad, generados por la presencia de un conjunto de contaminantes orgánicos emergentes aplicados en el agua de riego. Esto se comprobará determinando la biomasa producida, la concentración de clorofilas y el estrés oxidativo que presenten las diferentes muestras.

En este estudio, se incorporaron diferentes cantidades de biochar (0, 2,5% y 5%) en unas columnas (botellas de vidrio invertidas con la base cortada) que contenían suelo procedente de un campo agrícola de Viladecans. El cultivo era lechuga de tipo Maravilla. Este material se sometió a 8 riegos con contaminantes orgánicos emergentes (Triclosan, Bisfenol A, Ibuprofeno, Cafeína, Carbamazepina, Tonalida, Ácido clofíbrico, Furosemida, Metilo dihidrojasmonato, Sulfametazina, Hidrocloruro de propranolol, Tris(2-cloroetilo)fosfato i 17 α -Etiniloestradiol a una concentración final de riego de 15 ng de cada analito por mililitro). Las plantas eran regadas diariamente por goteo con una dosis de 100 mL con agua adicionada con solución nutritiva.

La adición de contaminantes orgánicos emergentes afectó negativamente la producción de biomasa y clorofilas. La incorporación de biochar en el suelo no contribuyó a contrarrestar el efecto de la presencia de contaminantes emergentes. En cuanto al estrés oxidativo, el almacenamiento del material vegetal a -20°C durante 5 meses no resultó idóneo para frenar la actividad de la enzima catalasa, y por lo tanto, no se ha detectado estrés. La evaluación de este método indica que cuando la concentración de peróxido de hidrógeno es baja el método pierde exactitud. La mínima cantidad que se pudo detectar con certeza razonable es de 2,5 ppm y la mínima cantidad que pudo ser medida con precisión y exactitud es de 8,48 ppm.



Abstract

Recently, the hydrological demand has increased while the supply has stayed the same or even, in some places, it has diminished. One possible solution to this problem is the use of recycled wastewater, mostly in places with scarcity of water. The main use of this water is in the agriculture and landscape restoration. However, the wastewaters treatment plants used for the water reclamation are not able to eliminate the presence of xenobiotics and, among them, the presence of emergent organic contaminants. In order to reduce the accumulation of these contaminants in the soil or in the crops, when watered with these waters, it can be reduced applying biochars in the soil.

The aim of this project is to study whether the incorporation of biochar in a soil is able to reduce the possible effects of toxicity generated by the presence of emergent organic contaminants applied together with the irrigation water. This will be tested by determining the produced biomass, the concentration of chlorophylls and the oxidative stress in different samples.

In this study we incorporated different quantities of biochar (0, 2,5% and 5%) in some columns (inverted glass bottles with its base cut) which contained soil from an agricultural land in Viladecans. The crop was Marvel lettuce. This material was submitted to 8 irrigations with emergent organic contaminants (Triclosan, Bisphenol A, Ibuprofen, Caffeine, Carbamazepine, Tonalide, Clofibric acid, Furosemide, Dihydrojasmonate methyl, sulfamethazine, Propranolol hydrochloride, Tris (2-chloroethyl) phosphate and 17 α -Ethinylestradiol in a final irrigation concentration of 15 ng of each analyte per millilitre.) The plants were watered by drip irrigation every day with a dose of 100 mL with water added with nutritive solution.

The addition of emergent organic contaminants affected negatively the biomass and chlorophylls production. The incorporation of biochar in the soil did not help to counteract the effect of the presence of emergent contaminants. Regarding the oxidative stress, the storage of vegetal material at -20°C during 5 months did not helped stopping the activity of catalase enzyme and, for this reason, we have not detected any stress. The evaluation of this method shows that when the concentration of hydrogen peroxide is low the method losses accuracy. The minimum quantity we could accurately detect is 2,5 ppm and the minimum quantity we could measure with precision and exactitude is 8,84 ppm.

Sumari

SÍMBOLS I ACRÒNIMS	10
AGRAÏMENTS	12
1. INTRODUCCIÓ	14
1.1 Reg amb aigües regenerades	14
1.1.1 Marc normatiu	18
1.2 Contaminants emergents	20
1.2.1 Descripció dels contaminants emergents assajats	24
1.3 Biochar	30
1.3.1 Interès del Biochar	30
1.3.2 Obtenció de Biochar i materials pirolitzables	32
1.4 Incorporació dels contaminants al sòl i plantes	34
1.5 Estrès oxidatiu dels contaminants en les plantes	35
1.6 Afectació de les clorofil·les per condicionants ambientals	37
1.7 Incorporació de contaminants a la cadena alimentària. Impacte a la salut	39
1.8 Context del treball	40
2. OBJECTIUS	43
2.1 Objectiu general	43
2.2 Objectius específics	43
3. MATERIALS I MÈTODES	45
3.1 Material vegetal	45
3.2 Característiques del sòl i solució nutritiva	45
3.3 Disseny de l'experiment	46
3.3.1 Biochar	46
3.3.2 Contaminants	48
3.3.3 Distribució i dosificació dels contaminants i biochar en els contenidors	49
3.3.4 Procediment de muntatge	52
3.3.5 Ubicació dels contenidors amb els tractaments establerts	53
3.3.6 Duració i condicions de cultiu	54
3.3.7 Reg	55
3.4 Determinació de la biomassa	56
3.5 Reactius utilitzats en la part experimental	57
3.6 Determinació de les clorofil·les	57

	5
3.6.1. Estima de les clorofil·les amb l'aparell SPAD OPTI-SCIENCES CCM-200.....	57
3.6.2. Extracció de clorofil·les.....	58
3.6.3. Quantificació de les clorofil·les	59
3.7. Tractament estadístic i programari.....	61
3.8. Determinació de l'estrès oxidatiu	61
3.9. Avaluació del mètode per a determinar estrès oxidatiu	65
4. RESULTATS	68
4.1. Resultats en la determinació de la biomassa	68
4.2. Resultats en la determinació de composició de clorofil·les	69
4.2.1. Patrons de calibratge SPAD-clorofil·les.....	69
4.2.2. Determinació del contingut de clorofil·les.....	72
4.3. Resultats en la determinació de l'estrès oxidatiu	75
4.3.1. Patró de l'estrès oxidatiu	75
4.3.2. Determinació de l'estrès oxidatiu en planta.....	77
4.4. Avaluació del mètode per a determinar l'estrès oxidatiu	77
5. DISCUSSIÓ	81
5.1. Efecte de l'addició de COEs en la biomassa i les clorofil·les	81
5.2. Efecte de l'addició de biochar en l'assaig	83
5.3. Anàlisi de l'estrès oxidatiu i avaluació del mètode	84
6. CONCLUSIONS	87
7. BIBLIOGRAFIA	88
ANEX 1. RESULTATS DE L'ANOVA DEL TRACTAMENT ESTADÍSTIC	97

Índex de figures

Figura 1. Recursos renovables reals d'aigua i aigües subterrànies per habitant a l'any 2005 (m ³ /any). Font: (3)	16
Figura 2. Sistemes de reutilització d'aigües municipals, per camp d'aplicació. Font: (3)	17
Figura 3. Esquema del moviment dels contaminants emergents en l'aigua. Font: (14)	21
Figura 4. Aspecte macroscòpic (esquerra) i microscòpic (dreta) del Biochar. Font: (18)	31
Figura 5. Beneficis del biochar al sòl i a l'atmosfera. Font: (21)	32
Figura 6. Diferències en el cicle del carboni amb aplicació de biochar i sense. Font: (21)	33
Figura 7. Estructura de les clorofil·les a i b. Font: (29)	37
Figura 8. Degradació química de les clorofil·les. Font: (30)	38
Figura 9. Planter d'enciam varietal Meravella utilitzat per a iniciar el treball (esquerra) i planta adulta (dreta)	45
Figura 10. Distribució del biochar i contaminants en els contenidors	50
Figura 11. Dosificació dels contaminants	52
Figura 12. Resultat final de procediment de muntatge	53
Figura 13. Ubicació dels contenidors amb els tractaments establerts	54
Figura 14. Aspecte dels enciams en el moment final de l'assaig experimental a Agròpolis	56
Figura 15. Aparell SPAD per a la mesura de clorofil·les. Font: (35)	58
Figura 16. Extracció de clorofil·les	59
Figura 17. Espectrofotòmetre utilitzat per la quantificació de clorofil·les	59
Figura 18. Determinació del pes sec dels discs	60

Figura 19. Procediment per determinar l'estrès oxidatiu; (A: pesada del teixit vegetal, B: homogeneïtzació, C: ultracentrifugació, D: mostres centrifugades, E: addició de reactius al sobrenedant, F: mesura d'absorbància amb espectrofotòmetre)	62
Figura 20. Dilucions de la solució d'H ₂ O ₂	64
Figura 21. Dilucions realitzades per a la realització de la recta de regressió patró	65
Figura 22. Diagrames de caixa del pes fresc de les fulles, pes sec de les fulles i pes sec de les arrels en funció del tractament amb un nivell de significança del 5% (BC: biochar)	69
Figura 23. Gràfica de quantificació de clorofil·les A	70
Figura 24. Gràfica de quantificació de clorofil·les B	70
Figura 25. Gràfica de quantificació de clorofil·les totals	71
Figura 26. Línies de tendència obtingudes a partir de les rectes de calibratge	71
Figura 27. Diagrames de caixa de la composició de clorofil·les A, B i totals en funció del tractament amb un nivell de significança del 5% (BC: biochar)	73
Figura 28. Recta de regressió patró per a la determinació de l'estrès oxidatiu	76

Índex de taules

Taula 1. Valors mínims que s'utilitzen per caracteritzar el dèficit hídric dins d'una regió. Font: (3)	15
Taula 2. Resum dels contaminants utilitzats. Font: (16)	27
Taula 3. Principals tipus de piròlisi. Font: (20)	34
Taula 4. Espècies reactives d'oxigen. Font: (28)	36
Taula 5. Característiques fisicoquímiques del sòl	46
Taula 6. Propietats dels tres biochars disponibles (B.E.T (Brunauer-Emmett-Teller): model matemàtic per a la mesura de superfície específica; BJH (Barret-Joyner-Halenda): mètode per al càlcul de distribucions de mida del porus; 4V/A: 4 vegades el volum entre l'àrea)	47
Taula 7. Contaminants utilitzats en l'assaig	48
Taula 8. Equacions simultànies per quantificar Clorofil·les en teixit vegetal a partir de valors d'absorbància (A) utilitzant cubetes d'1 cm. Font: (37)	60
Taula 9. Resultats de la determinació de la biomassa amb un nivell de significança del 5% (0: Control; 1: Contaminant/no biochar; 2: Contaminant/2.5% biochar; 3: Contaminant/5% biochar; P.F.F: pes fresc fulles; P.S.F: pes sec fulles; P.S.A: pes sec arrels) (Els promitjos que continguin la mateixa lletra no són significativament diferents)	68
Taula 10. Resultats de la composició de clorofil·les A, B i totals amb un nivell de significança del 5% (0: Control; 1: Contaminant/no biochar; 2: Contaminant/2.5% biochar; 3: Contaminant/5% biochar) (Els promitjos que continguin la mateixa lletra no són significativament diferents)	72
Taula 11. Resultats de la composició de clorofil·les A segons la posició de la fulla i el tractament, amb un nivell de significança del 5% (0: Control; 1: Contaminant/no biochar; 2: Contaminant/2.5% biochar; 3: Contaminant/5% biochar) (Els promitjos que continguin la mateixa lletra no són significativament diferents)	74
Taula 12. Resultats de la composició de clorofil·les B segons la posició de la fulla i el tractament, amb un nivell de significança del 5% (0: Control; 1: Contaminant/no biochar; 2: Contaminant/2.5% biochar; 3: Contaminant/5% biochar) (Els promitjos que continguin la mateixa lletra no són significativament diferents)	74

Taula 13. Resultats de la composició de clorofil·les totals segons la posició de la fulla i el tractament, amb un nivell de significança del 5% (0: Control; 1: Contaminant/no biochar; 2: Contaminant/2.5% biochar; 3: Contaminant/5% biochar) (Els promitjos que continguin la mateixa lletra no són significativament diferents) _____ 75

Taula 14. Determinació de la recta de regressió patró _____ 76

Taula 15. Valors d'absorbància i contingut d'H₂O₂ fortificant a 300ppm i 50ppm _____ 78

Taula 16. Valors de mitjana, desviació estàndard i exactitud de les mostres fortificades _____ 78

Taula 17. Paràmetres per a determinar el límit de quantificació i el límit de detecció del mètode 79

Símbols i acrònims

PPCPs	Medicaments i productes per a la cura personal
COP	Contaminant orgànic persistent
COE	Contaminant orgànic emergent
PBDE	Èters difenils polibromats
DBP	Subproductes de la desinfecció
MTBE	Tert-butil metil èter
ROS	Espècies reactives d'oxigen
IUPAC	Unió Internacional de Química Pura i Aplicada
TCS	Triclosan
BPA	Bisfenol A
IBU	Ibuprofè
CAF	Cafeïna
CBZ	Carbamazepina
TON	Tonalida
CFA	Àcid clofíbric
FUR	Furosemida
MDHJ	Metil dihidrojasmonat



SMT	Sulfamethazina
PROP	Hidroclorur de propranolol
TCEP	Tris(2-cloroetil)fosfat
EES	17 α -Etinilestradiol
TCA	Àcid tricloroacètic
LOD	Límit de detecció
LOQ	Límit de quantificació
LSD	Diferència mínima significativa
UV	Ultraviolat
T_{1/2}	Vida mitjana
S_a	Desviació estàndard de l'ordenada
\bar{Y}_0	Senyal mitjana
S_{\bar{Y}_0}	Desviació estàndard de la senyal mitjana
EDAR	Estació depuradora d'aigües residuals
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetà
BC	Biochar

Agraïments

En primer lloc m'agradaria donar les gràcies a la meva tutora Dra. Núria Cañameras per haver-me ajudat en tota la realització i correcció del treball. En segon lloc m'agradaria agrair a tot l'equip de l'Institut de Diagnosi Ambiental i Estudis de l'Aigua (CSIC), en especial al Dr. Josep M. Bayona, a la Carmen Domínguez i al Carles Hurtado, per haver-me ajudat en la realització de la part experimental del treball i per resoldre'm qualsevol dubte que se m'ha plantejat. També m'agradaria donar les gràcies al Miquel Masip per la seva dedicació en l'hivernacle, a l'Olga Gener i a l'Enric Centellas per la seva ajuda en el laboratori i a la Nuria Carazo i a la Dra. Lúdia Serrano per la seva ajuda en el desenvolupament del treball.

Finalment, m'agradaria agrair a la família i amistats el recolzament que m'han donat en tot moment.

INTRODUCCIÓ

1. Introducció

1.1 Reg amb aigües regenerades

La reutilització d'aigües residuals depurades en agricultura és una opció que s'està duent a terme cada vegada més en regions amb escassetat d'aigua. La demanda d'aigua creix cada vegada més a causa de l'augment de la població, i l'oferta hídrica es manté igual o disminueix a causa de l'escalfament global provocat pel canvi climàtic (1).

L'agricultura consumeix aproximadament un 70% de l'aigua mundial, principalment en la producció d'aliments i fibres i en el processat de productes agrícoles. La falta de recursos hídrics provinents d'aqüífers, rius i llacs, provocat per pluges insuficients o irregulars i també per a un augment de la demanda degut a un increment de la població, ha donat pas al reciclatge d'aigües residuals domèstiques i municipals per al reg agrícola i d'espais verds. Aquesta reutilització de l'aigua planteja, sovint, possibles problemes de qualitat de l'aigua i de salut i acceptació pública, comercialitat dels cultius i finançament (1,2).

La Terra conté aproximadament 1351 milions de km³ d'aigua, però només el 0,003% és aigua dolça, aigua apta per beure, higiene, agricultura i indústria. D'aquesta aigua dolça s'estima que només de 9000 a 14000 km³ es troben disponibles per al consum humà cada any. A més a més, la població mundial està creixent aproximadament a una taxa d'1,2% a l'any. Aquest augment encara dificultarà més que hi hagi aigua disponible amb qualitat sanitària per a tota la població (3).

Hi ha diferents necessitats d'aigua, que són: aigua potable, agricultura i ramaderia, higiene i sanitat pública, usos domèstics (preparació d'aliments, neteja), comerç i serveis, indústria, activitats recreatives i turisme, pesca comercial i aquicultura, manteniment ecològic i conservació i protecció del medi ambient.

En la taula 1 es poden observar els indicadors que s'han creat per mesurar l'escassetat relativa d'aigua. L'Índex d'Escassetat d'Aigua, que es basa en la disponibilitat per càpita d'aigua dolça renovable (superficial i subterrània), representa el potencial d'aigua que pot utilitzar una persona sense considerar la infraestructura hídrica o l'ús econòmic. L'Índex d'Intensitat d'Ús de l'Aigua expressa la quantitat d'extracció d'aigua superficial i subterrània com percentatge dels recursos hídrics renovables interns que es troben disponibles per una regió (Taula 1 i Figura 1).



Taula 1. Valors mínims que s'utilitzen per caracteritzar el dèficit hídric dins d'una regió. Font: (3)

Característica	Límit	Situació
Índex d'Escassetat d'Aigua, m³/càpita/any		
Dèficit hídric	<1700	La regió comença a experimentar dèficit hídric i l'economia o la salut humana es poden veure perjudicades.
Escassetat crònica d'aigua	<1000	La regió experimenta freqüents problemes de subministrament d'aigua, tant a curt com a llarg termini.
Dèficit hídric absolut	<500	La regió completa el seu subministrament d'aigua a través de la dessalinització de l'aigua, sobreexplotant els aqüífers o realitzant una reutilització no planificada de l'aigua.
Nivell mínim de supervivència	<100	El subministrament d'aigua per a usos domèstics i comercials es veu compromès, donat que la total disponibilitat no és suficient per satisfer la demanda per tots els usos (municipal, agrícola i industrial).
Índex d'Intensitat d'Ús de l'Aigua		
Dèficit hídric	>20%	La regió experimenta greus problemes de subministrament d'aigua que són abordats mitjançant la reutilització d'aigües residuals (planificada o no), sobreexplotació d'aqüífers (entre 2 a 30 vegades) o dessalinització de l'aigua de mar.

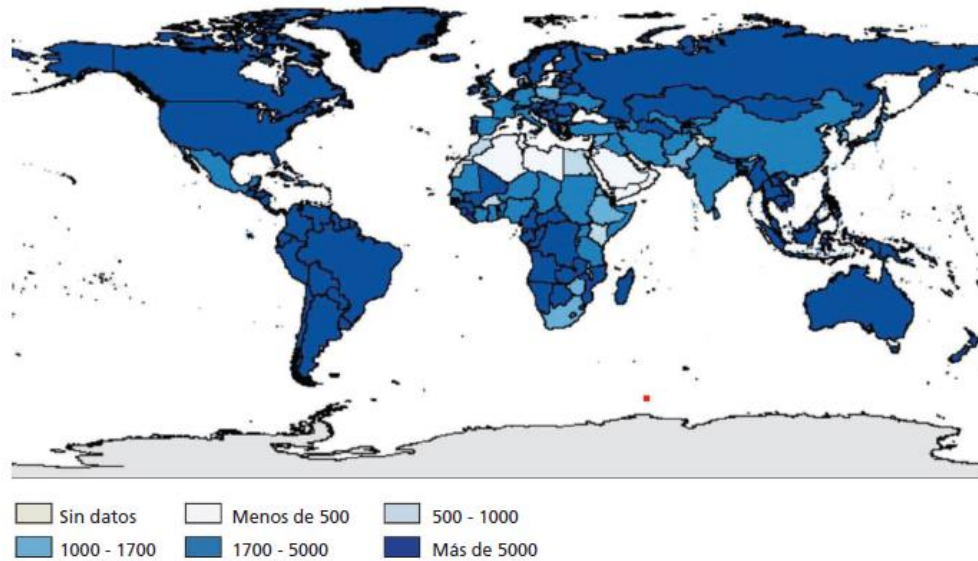


Figura 1. Recursos renovables reals d'aigua i aigües subterrànies per habitant a l'any 2005 (m^3/any). Font: (3)

L'augment de la urbanització i de l'agricultura de regadiu provoquen que els recursos hídrics disponibles no vagin d'acord amb el moment i el lloc de la demanda. A causa d'això, han calgut construir preses per emmagatzemar l'aigua i canals per a poder-la distribuir (4).

Dos possibles solucions a aquest problema són la utilització d'aigua dessalinitzada (opció relativament cara) i la utilització d'aigua regenerada (4).

La regeneració d'aigües residuals i la seva reutilització en l'agricultura suposa una gran solució en molts països amb escassetat d'aigua. Aquest sistema permet equilibrar l'oferta i la demanda d'aigua en molts usos. El valor de l'aigua regenerada ha estat reconegut àmpliament pels agricultors, no només com a recurs hídric, sinó també pel seu contingut de nutrients-fertilitzants, que disminueixen els costos de fertilització (5). Per aquest motiu, s'estima que un 10% del total de les terres de regadiu, principalment localitzades en països en vies de desenvolupament, estan regades amb aigües residuals sense tractar o parcialment tractades.

Actualment existeixen més de 3300 instal·lacions de regeneració d'aigua a nivell mundial amb diferents graus de tractament i per diverses aplicacions: reg agrícola, disseny urbà i usos recreatius, processament i refrigeració industrial i producció indirecta d'aigua potable (recàrrega d'aigües subterrànies o abocament als rius) (3).

La figura 2 mostra el número de sistemes de reutilització d'aigua municipal en les diferents regions del món segons la utilització que se li dona posteriorment a l'aigua.

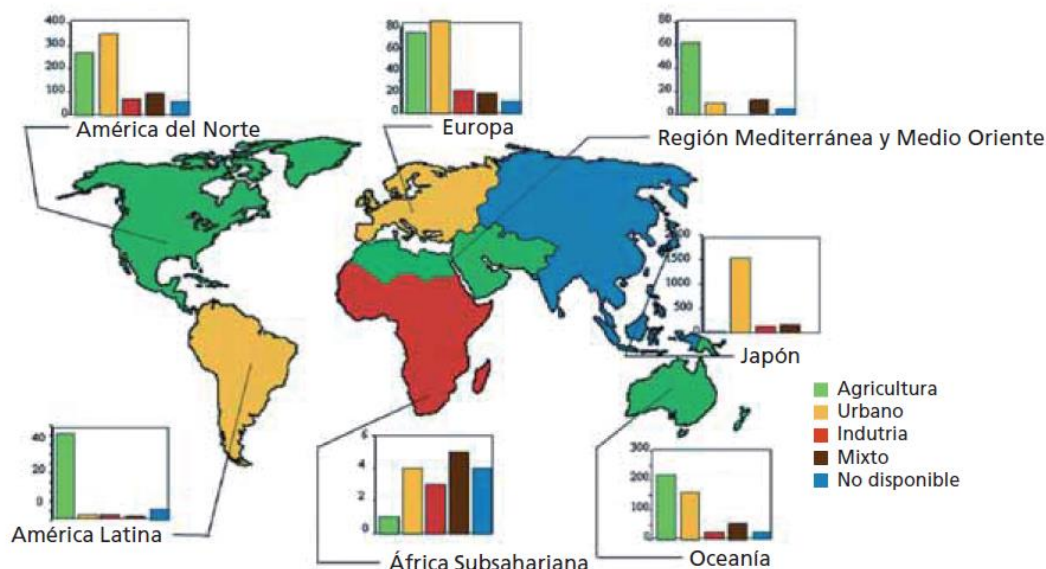


Figura 2. Sistemes de reutilització d'aigües municipals, per camp d'aplicació. Font: (3)

Els tractaments que es duen a terme en aigües residuals municipals per tal de regenerar l'aigua són (7):

- Preliminar: filtració i eliminació d'arena. Elimina materials sòlids grossos i altres materials grans que es troben amb molta freqüència a les aigües residuals sense tractar.
- Primari: sedimentació simple dels materials sòlids en un tanc de sedimentació primària. Les partícules sòlides precipiten al fons i els olis i grasses suren a la superfície. Aquest material es elimina com a fang per un tractament apartat.
- Secundari: eliminació addicional de contaminants, normalment mitjançant processos biològics per eliminar material orgànic dissolt. Les aigües residuals que provenen del tractament primari passen a un tanc d'aeració, on creixen microorganismes que consumeixen la matèria orgànica restant. Després de la aeració, es clarifica la barreja en un sedimentador secundari. El residu sedimentat es elimina com a fang, per un tractament i abocament per separat.
- Terciari: implica l'eliminació de contaminants específics o contaminants industrials específics. A continuació, l'afluent pot desinfectar-se per eliminar microorganismes perjudicials mitjançant cloració o desinfecció ultraviolada.

Els sectors econòmics i socials vinculats a la reutilització són amplis. Segons estableix la normativa vigent a Espanya (8) els usos als quals va dirigida la reutilització són:

- Urbans
 - Residencials (reg de jardins privats, descàrrega aparells sanitaris)
 - Serveis (reg d'espais públics, neteja de carrers, sistemes contra incendis, rentat industrial de vehicles)
- Agrícoles
 - Reg de superfícies agrícoles
- Industrials (excepte indústria alimentària)
- Recreatius
 - Reg de camps de golf
 - Estanys o basses ornamentals
- Ambientals
 - Recàrrega d'aqüífers
 - Manteniment de cabals
 - Aportacions d'aigua a zones humides

En el cas de l'agricultura hi ha una sèrie de mesures que s'han de complir, i aquestes són (3):

- Garantia total de disponibilitat del recurs (l'aigua) davant altres fonts de subministrament potencialment condicionades per factors no controlables (ex. episodis de sequera).
- Qualitat constant de l'aigua (en captacions al medi la qualitat pot estar subjecte a deterioraments per episodis de contaminació).
- Estalvi en fertilitzants, donat que l'aigua regenerada incorpora certa càrrega orgànica i de nutrients.
- Estalvi econòmic quan la reutilització substitueix volums d'aigua procedents d'un embassament, donat que s'elimina el cànon de regulació que fixa cada embassament pels usuaris de l'aigua que subministra.

1.1.1 Marc normatiu

El marc normatiu de la reutilització es compon de diferents nivells, que no només es refereixen a les instàncies amb capacitat normativa sobre la matèria (Unió Europea, Estat i Generalitat de Catalunya), sinó que vénen donats també per la confluència de la normativa que regula el



sanejament i la depuració de les aigües residuals, sobre les quals es sustenta la regeneració. La normativa específica sobre la reutilització de l'aigua regenerada es centra en la qualitat requerida en funció dels usos i en el títol jurídic que ha de permetre tant l'exercici d'aquesta activitat com l'ús de l'aigua regenerada.

- Legislació comunitària

Directiva 91/271/CEE del consell, de 21 de maig de 1991, sobre el tractament de les aigües residuals urbanes.

La **Directiva 91/271/CEE** obliga als estats membres a vetllar per tal que les aglomeracions urbanes disposin d'un sistema de col·lectors adient i d'un tractament adequat de les aigües residuals urbanes. Igualment regula les concentracions màximes dels efluents depurats abocats a la llera pública (9).

Directiva 2000/60/CE, del Parlament i del Consell, de 23 d'octubre de 2000, per la qual s'estableix un marc comunitari d'actuació en l'àmbit de la política d'aigües.

La Directiva sanciona uns objectius en virtut dels quals els estats membres hauran de definir i d'aplicar les mesures adients per aconseguir i mantenir el bon estat ecològic de les masses d'aigua. En les masses més sensibles, l'assoliment d'aquests objectius pot arribar a fer necessària l'eliminació dels abocaments urbans, mitjançant mesures de reutilització (10).

- Legislació estatal

Reial Decret 1620/2007, de 7 de desembre, pel qual s'estableix el règim jurídic de la reutilització de les aigües depurades.

Mitjançant aquest RD, el Govern ha donat compliment al mandat contingut en l'article 109 del Text refós de la Llei d'Aigües i estableix la regulació reglamentària que ha de facilitar l'accés i ús de les aigües regenerades. A tal fi, fixa els requisits qualitatius de les aigües regenerades en funció de l'ús al que es vulguin destinar i estableix els mecanismes de control, determinant la freqüència de mostres, els anàlisi de cada paràmetre i els criteris d'avaluació de la qualitat de les aigües regenerades. Per reforçar la garantia d'aquestes aigües preveu la intervenció vinculant de l'autoritat sanitària.

Per altra banda, en el Capítol IV, article 7 del mateix, s'especifica que per tal de fomentar la reutilització de l'aigua i l'ús més eficient dels recursos hídrics, les Administracions Públiques estatals, autonòmiques o locals, en l'àmbit de les seves respectives competències, podran dur a terme plans i programes de reutilització d'aigües (8).

Reial Decret 907/2007, de 6 de juliol, pel qual s'aprova el Reglament de la Planificació Hidrològica. Aquest RD estableix que la planificació hidrològica es guiarà per criteris de sostenibilitat en l'ús de l'aigua mitjançant la gestió integrada, la protecció a llarg termini dels recursos hídrics, i la prevenció del deteriorament de l'estat de les aigües, per tal de satisfer les demandes i incrementar les disponibilitats de recurs (8).

1.2 Contaminants emergents

Es pot dir que els contaminants es poden classificar en dos grans grups, els prioritaris i els no prioritaris o emergents. Fins fa relativament poc temps, els estudis i la legislació només es centraven en els contaminants prioritaris, com poden ser els plaguicides, els compostos clorats o el DDT (organoclorat que contenen alguns insecticides). Són prioritaris a causa de la seva toxicitat, les seves implicacions ambientals i el seu volum de producció (11).

A part d'aquests contaminants prioritaris, n'hi ha molts altres que estan presents en el medi ambient a causa de l'activitat humana. Aquests contaminants s'anomenen no prioritaris o emergents, i no estan legislats. Han pres més importància en els darrers anys perquè cada vegada hi ha tècniques i instrumentació analítica que permeten detectar més compostos i en concentracions més petites. A més a més, moltes d'aquestes substàncies són utilitzades en grans quantitats i en molts materials i productes de consum massiu (12).

Bona part d'aquests contaminants es descarreguen al medi ambient de forma contínua a través dels sistemes d'aigües residuals domèstiques o industrials (13), i tal com s'observa a la figura 3, estan en constant moviment a través de l'aigua.

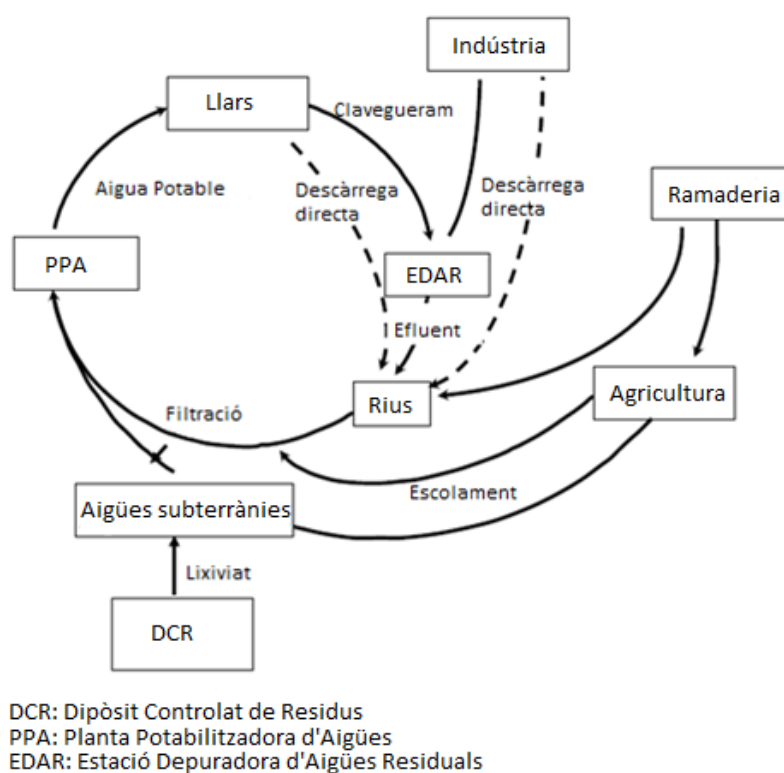


Figura 3. Esquema del moviment dels contaminants emergents en l'aigua. Font: (14)

Dins d'aquest grup de contaminants emergents s'hi poden trobar productes farmacèutics, additius plàstics, drogues il·legals i productes cosmètics i de perfumeria. Tots aquests contaminants tenen diferents usos i característiques fisicoquímiques, toxicològiques i implicacions mediambientals molt diferents. Una possible classificació dins d'aquest gran grup seria en funció de la seva finalitat (15):

- Productes farmacèutics

Aquest grup de contaminants inclou tant els medicaments d'ús humà com els d'ús veterinari, les drogues il·legals i els suplementos nutricionals. La forma d'entrada al medi ambient per part d'aquests productes es dona bàsicament a través de dos formes: a través de l'excreció d'una part dels medicaments que es consumeixen i l'abocament de medicaments caducats a les escombraries. Tant d'una manera com de l'altra, si no hi ha un tractament a les depuradores, aquests productes acaben a les aigües.

Una de les majors preocupacions per part d'aquests tipus de contaminants és la gran quantitat d'efectes que poden provocar a éssers vius amb constant exposició, ja que estan dissenyats per a que siguin bioactius. Una altra preocupació és l'augment de la resistència bacteriana als antibiòtics.

- Productes d'higiene i cura personal
 - Ionol i compostos relacionats

Aquest grup de contaminants inclou els antioxidants no tòxics emprats a la indústria alimentària i cosmètica. Aquests productes no són cancerígens, però s'ha comprovat que tenen la capacitat de modular o modificar l'acció d'altres substàncies carcinògenes.

- Fragàncies

S'utilitzen principalment en cosmètica i en detergents. Són contaminants relativament persistents i amb capacitat de bioconcentració, i fins i tot alguns poden ser tòxics o cancerígens.

- Filtres UV

Són compostos aromàtics que solen adsorbir-se als sediments, i una gran quantitat són eliminats a través de processos de fotodegradació. Aquests filtres també tendeixen a acumular-se als teixits greixosos.

Els efectes que provoquen són disrupció endocrina i/o efectes estrogènics. Un altre efecte es dona en les piscines, ja que la concentració de filtres UV pot ser elevada i la seva degradació fotocatalítica juntament amb el clor desinfectant pot donar lloc a compostos clorats possiblement tòxics.

- Retardants de flama

Els retardants de flama s'utilitzen principalment com a additius en plàstics, escumes i materials tèxtils. Els més importants són els èters difenils polibromats (PBDE).

La seva presència al medi ha augmentat molt en els darrers anys a causa de la seva major utilització. Com a conseqüència, es poden classificar com a contaminants orgànics persistents (COP) i presenten bioacumulació deguda a la seva lipofilitat.

La Unió Europea classifica els PBDE com a substàncies prioritàries, amb uns límits molt baixos en aigües superficials.

Els efectes tòxics d'aquests contaminants podrien provocar càncer o neurotoxicitat. A més a més, els PBDE presenten efectes de disrupció endocrina.

- Nitrosamines

Aquest tipus de contaminants es formen com a subproducte de desinfecció degut a la cloració de l'aigua de consum humà i es troba present en el fum del tabac.

Totes les nitrosamines estan considerades altament tòxiques i cancerígenes.

- Tensioactius

Aquests productes tenen diverses aplicacions com, per exemple, en la neteja de la llar, com a emulsificants en la indústria tèxtil, com a polímers i en herbicides i insecticides.

La seva toxicitat és més elevada en organismes aquàtics que en mamífers. Actualment s'utilitzen tensioactius el més biodegradables possible a causa de la gran problemàtica ambiental que provoquen.

- Plastificants i additius dels plàstics

Els plastificants són substàncies que s'afegeixen als polímers per aconseguir una modificació de les propietats.

La presència d'aquests compostos ha augmentat molt en els darrers anys, ja que el plàstic es troba en gairebé totes les activitats humanes. Alguns exemples de plastificants són ftalats, fosfats d'aquil i aril, bisfenol A, isobutirats, etc.

- Additius de combustibles

Dins d'aquest grup de contaminants s'hi poden incloure els compostos oxigenats presents en els combustibles. Aquests compostos, com per exemple el tert-butil metil èter (MTBE), s'incorporen per substituir el plom que s'afegia anteriorment per a la millora de l'octanatge.

El MTBE està molt present en el medi ambient, però és biodegradable i no presenta efectes carcinògens importants. Tot i això, en alguns països s'està substituint per altres èters.

1.2.1 Descripció dels contaminants emergents assajats

En aquest treball s'han utilitzat uns contaminants en particular que es detallen a continuació:

- Triclosan (TCS)

Agent desinfectant antibacterià i fungicida present en molts productes cosmètics (sabons, pastes de dents, desodorants...) i també en altres productes de consum com materials de plàstic, joguines, etc. (16).

- Bisfenol A (BPA)

Producte químic retardant de flama que s'utilitza com a component per a la fabricació de policarbonat (tipus de plàstic rígid transparent que s'utilitza per fer envasos per alimentació i molts altres objectes) i resines epoxi-fenòliques (utilitzades en recobriments i revestiments de conserves i dipòsits d'aliments i begudes).

Actualment, aquesta substància està autoritzada per la fabricació de materials plàstics mitjançant el Reglament (UE) 10/2011 de la Comissió, de 14 de gener de 2011, sobre materials i objectes plàstics destinats a entrar en contacte amb aliments (16).

- Ibuprofè (IBU)

L'Ibuprofè és un fàrmac antiinflamatori no esteroïdal (AINE). Funciona reduint les hormones que causen inflamació i dolor en el cos humà.

És un dels fàrmacs amb major consum per la població actual (16).

- Cafeïna (CAF)

És un compost químic que es troba en la naturalesa en les llavors de cafè, de cacau (xocolata) i de cola. És estimulants del sistema nerviós central, el cor i la respiració. També té efectes diürètics (16).

- Carbamazepina (CBZ)

És un fàrmac que s'utilitza com anticonvulsionant, disminuint els impulsos dels nervis que causen convulsions i dolor (16).



- Tonalida (TON)

És una substància química englobada en el grup dels almescs policíclics. És una fragància sintètica que es troba en perfums, colònies, detergents i cosmètics. S'ha constatat, per exemple, la presència d'aquesta substància en la grassa i en la llet materna (16).

- Àcid clofíbric (CFA)

Substància química utilitzada com a regulador lipídic, en general per tractar hiperlipidèmies. En molts casos s'utilitza per disminuir els nivells de colesterol en plasma (16).

- Furosemida (FUR)

És un fàrmac de tipus diürètic. La seva acció principal s'exerceix sobre el ronyó facilitant l'eliminació d'aigua de l'organisme. Es recomana principalment en casos d'acumulació excessiva d'aigua en l'organisme, com en els casos d'edema cardíac, renal o hepàtic (16).

- Metil dihidrojasmonat (MDHJ)

Dihidrojasmonat de Metil és un èster que es troba naturalment en el gessamí. S'utilitza en la composició de bases per a perfumeria en molt baixa concentració. Està registrat comercialment amb el nom de hedione (16).

- Sulfametazina (SMT)

És un antibacterià que pertany a la família de les sulfamides. Presenta un ampli rang d'acció, afectant a diferents microorganismes. Té unes característiques farmacocinètiques en remugants que permet l'administració per diferents vies amb una bona biodisponibilitat, una bona distribució a través dels teixits i una llarga permanència en l'organisme (16).

- Hidroclorur de propranolol (PROP)

El Propranolol és un bloquejador beta. Els betabloquejants afecten el cor i la circulació (flux de sang a través d'artèries i venes).

El propranolol s'utilitza per tractar tremolors, angina (dolor de pit), hipertensió (pressió arterial alta), trastorns del ritme cardíac, i altres problemes cardíacs o circulatoris. També s'utilitza per a tractar o prevenir atacs de cor i per reduir la gravetat i freqüència dels mals de cap per migranya (16).

- Tris(2-cloroetil)fosfat (TCEP)

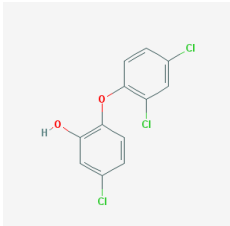
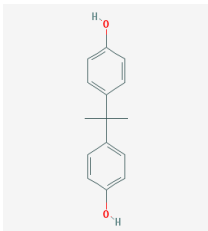
Tris(2-cloroetil) fosfat (TCEP) és un compost químic que s'utilitza com a retardant de flama, plastificant, i regulador de la viscositat en diversos tipus de polímers que inclouen poliuretans, resines de polièster, i poliacrilats (16).

- 17 α -Etinilestradiol (EES)

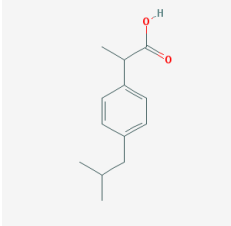
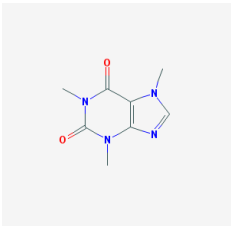
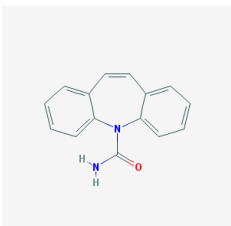
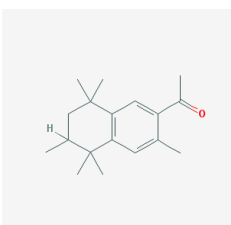
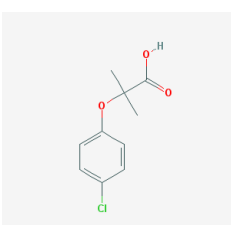
L'Etinilestradiol és un derivat sintètic de l'estrogen natural estradiol. És un dels dos estrògens que s'utilitzen actualment a les píndoles anticonceptives orals. L'altre, mestranol, es converteix en etinilestradiol abans que sigui biològicament actiu (16).

En la taula 2 es troba un resum dels contaminants utilitzats amb algunes de les seves característiques.

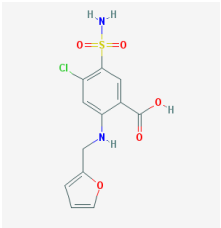
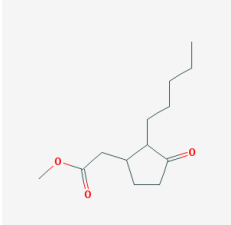
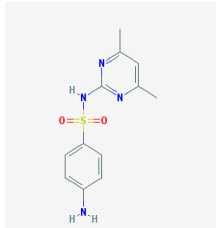
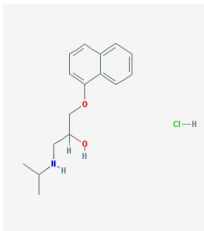
Taula 2. Resum dels contaminants utilitzats. Font: (16)

Contaminant	Ús	Nom científic	Fórmula molecular	Pes molecular (g/mol)	Estructura química
Triclosan	Desinfectant	5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol	$C_{12}H_7Cl_3O_2$	289,54	
Bisfenol A	Retardant de flama	4-[2-(4-hidroxifenil)propan-2-il]fenol	$C_{15}H_{16}O_2$	228,29	

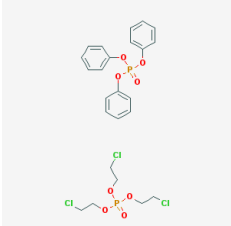
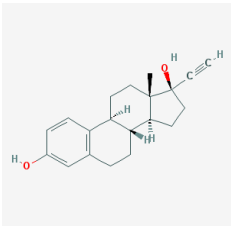
"Continuació taula 2"

Contaminant	Ús	Nom científic	Fórmula molecular	Pes molecular (g/mol)	Estructura química
Ibuprofè	Agent analgèsic i antiinflamatori	2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanoic àcid	$C_{13}H_{18}O_2$	206,28	
Cafeïna	Estimulant psicomotor	1,3,7-trimetilpurina-2,6-diona	$C_8H_{10}N_4O_2$	194,19	
Carbamazepina	Agent antiepilèptic	benzo[b][1]benzazepina-11-carboxamida	$C_{15}H_{12}N_2O$	236,27	
Tonalida	Fragància sintètica	1-(3,5,5,6,8,8-hexametil-6,7-dihidronaftalen-2-il)etanona	$C_{18}H_{26}O$	258,40	
Àcid clofíbric	Regulador de lípids	2-(4-clorofenoxi)-2-metilpropanoic àcid	$C_{10}H_{11}ClO_3$	214,65	

“Continuació taula 2”

Contaminant	Ús	Nom científic	Fórmula molecular	Pes molecular (g/mol)	Estructura química
Furosemida	Agent diürètic	4-cloro-2-(furan-2-ilmetilamino)-5-sulfamoilbenzoic àcid	$C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$	330,74	
Metil dihidrojasmonat	Fragància sintètica	metil 2-(3-oxo-2-pentilciclopentil)acetat	$C_{13}H_{22}O_3$	226,31	
Sulfametazina	Agent antibacterià	4-amino-N-(4,6-dimetilpirimidina-2-yl)benzenesulfonamida	$C_{12}H_{14}N_4O_2S$	278,33	
Hidroclorur de propanolol	Bloquejador beta	1-naftalen-1-ilo-3-(propan-2-ilamino)propan-2-ol;hidroclorur	$C_{16}H_{22}ClNO_2$	295,80	

“Continuació taula 2”

Contaminant	Ús	Nom científic	Fórmula molecular	Pes molecular (g/mol)	Estructura química
Tris(2-cloroetil)fosfat	Retardant de flama	tris(2-cloroetil) fosfat	$C_9H_{21}Cl_3O_7P_2$	409,57	
17α-Ethinilestradiol	Hormona sintètica	(8R,9S,13S,14S,17R)-17-etinil-13-metil-7,8,9,11,12,14,15,16-octahidro-6H-ciclopenta[a]fenantrena-3,17-diol	$C_{20}H_{24}O_2$	296,40	

1.3 Biochar

1.3.1 Interès del Biochar

El biochar és un producte que s’obté a partir del procés de piròlisi, que consisteix en la descomposició tèrmica de la matèria orgànica, a baixa o nul·la concentració d’oxigen i a temperatures relativament baixes (<700°C) (17). Tal com s’observa a la figura 4, aquest producte té una aparença semblant al carbó vegetal i presenta una estructura microporosa que li dóna una gran capacitat d’adsorció d’aigua i de nutrients i proporciona un refugi ideal per al desenvolupament dels microorganismes.

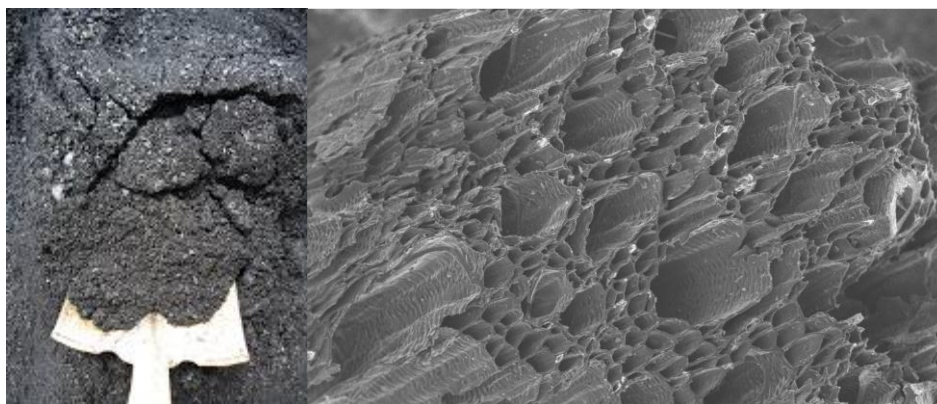


Figura 4. Aspecte macroscòpic (esquerra) i microscòpic (dreta) del Biochar. Font: (18)

La figura 5 mostra com l'aplicació de biochar al sòl aporta beneficis al propi sòl i a les plantes i també a l'atmosfera. Un dels principals beneficis és la millora de la fertilitat, que engloba la reducció de fertilitzants químics i la millora de la producció de cultiu. La seva estructura permet augmentar la retenció de nutrients i aigua i millorar la vida microbiana al sòl i per tant l'activitat biològica. A més a més, el biochar s'ha estudiat com a possible adsorbent de contaminants orgànics i pesticides del sòl (19).

Pel que fa a la part econòmica, la producció de biochar ofereix una forma rendible de gestionar els residus, ja que un residu es transforma en un producte del qual es poden obtenir beneficis (20).

L'aplicació de biochar també té beneficis ambientals, que ajuden a lluitar contra el canvi climàtic. La capacitat d'adsorció i retenció del biochar disminueix la pèrdua de nutrients i contaminants per rentat, evitant la contaminació dels rius, llacs i aqüífers. Per altra banda també es capaç de reduir les emissions de metà, òxid nitrós i diòxid de carboni del sòl, tres gasos responsables de l'efecte hivernacle (17,20,21).

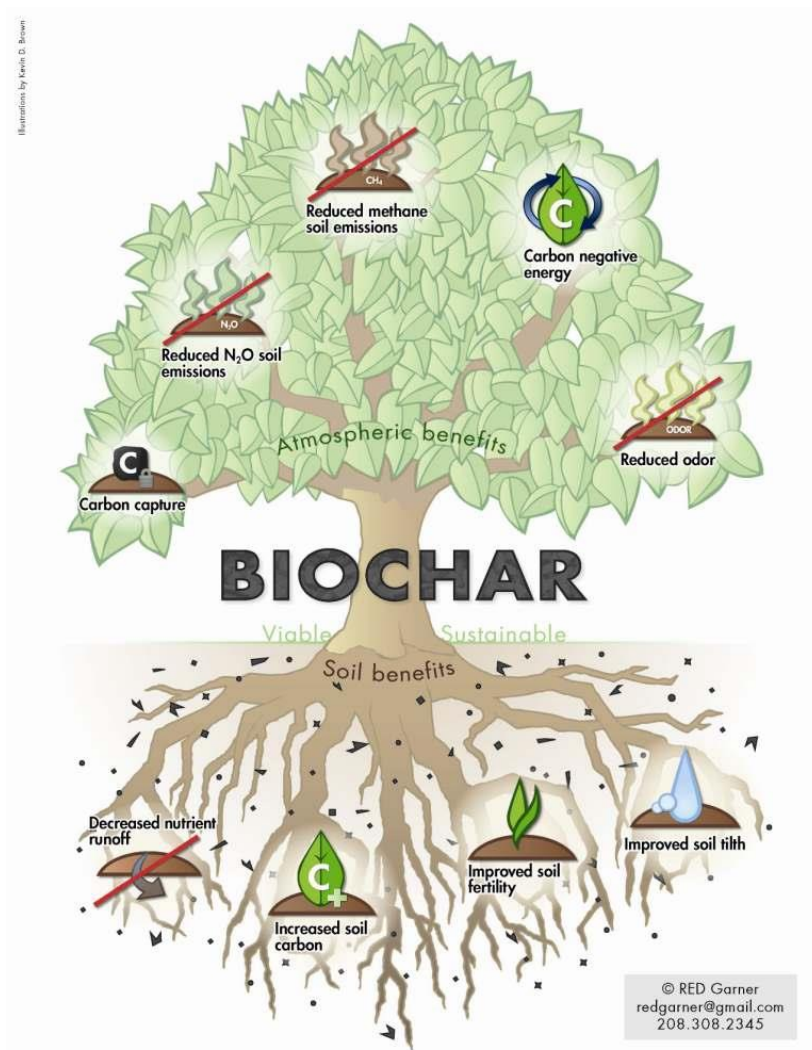


Figura 5. Beneficis del biochar al sòl i a l'atmosfera. Font: (21)

1.3.2 Obtenció de Biochar i materials pirolitzables

La combustió tradicional de la biomassa allibera un 84% de carboni a l'atmosfera i un 3% de residu sòlid com a carboni estable. En canvi, quan es porta a terme una carbonització de la biomassa mitjançant un procés de piròlisi, s'allibera un 50% de carboni a l'atmosfera i un 50% queda retingut en forma de residu sòlid (22). Aquest residu és el biochar i és altament estable, es descompon molt lentament en el sòl i es manté en ell durant molt temps. Aquest carboni que queda segrestat no va a l'atmosfera directament i entra en un cicle molt més lent.

D'aquesta manera s'aconsegueix una reducció global del CO_2 atmosfèric, obtenint com a resultat una producció negativa de CO_2 (Figura 6) (21).

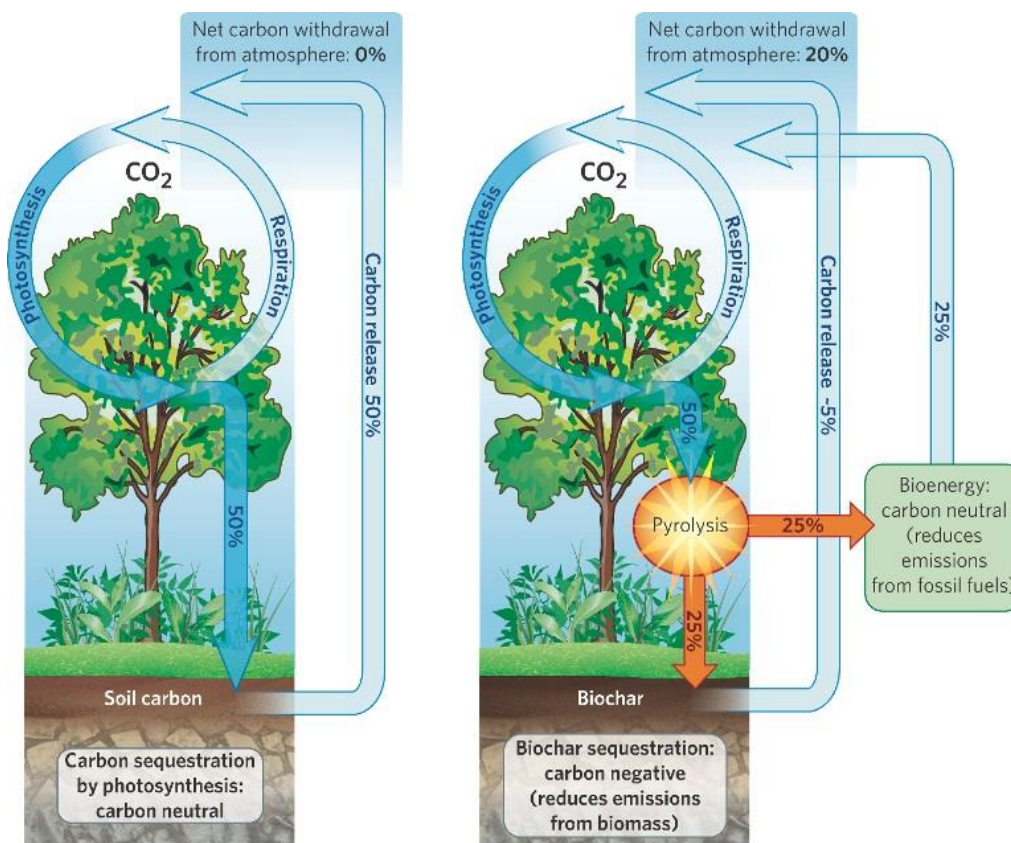


Figura 6. Diferències en el cicle del carboni amb aplicació de biochar i sense. Font: (21)

Hi ha una gran varietat de materials pirolitzables (fusta, fems, fangs de depuradores, residus agrícoles...) i de tecnologies de piròlisi (temperatura de piròlisi, temps de residència...) que determinen un ampli ventall de biochars amb propietats físiques, químiques i biològiques molt contrastades (18).

Els processos de piròlisi generen gasos inflamables, gasos condensables inflamables (bioolis) i biochar en proporcions variables segons el tipus de piròlisi. Els principals tipus de piròlisi per a la producció de biochar es detallen a la taula 3. El procés de piròlisi que aconsegueix un major rendiment de producció de biochar és la piròlisi lenta, que es basa en la combustió parcial de la

biomassa a través d'un escalfament lent i uniforme a una temperatura entre 450 i 650 °C i anòxica, amb un temps de residència llarg (de hores a dies) (20).

Taula 3. Principals tipus de piròlisi. Font: (20)

Procés	Temperatura de piròlisi	Temps de residència	Líquid (biooli)	Sòlid (biochar)	Gas de síntesi (syngas)
Piròlisi ràpida	Moderada (500°C)	Curt (<2s)	75% (25% aigua)	12%	13%
Piròlisi lenta	Baixa-moderada (450-650°C)	Llarg	30% (70% aigua)	35%	35%
Gasificació	Elevada (>800°C)	Llarg	5% (5% aigua)	10%	85%

1.4 Incorporació dels contaminants al sòl i plantes

Els PPCPs poden incorporar-se al sòl a través de varies rutes, com vessaments, partícules en suspensió, fertilitzants orgànics i biosòlids. Una de les principals fonts d'incorporació de PPCPs al sòl es dona a conseqüència de l'aplicació d'adob i biosòlids als cultius agrícoles (23). Pel que fa al medi aquàtic, l'entrada principal de contaminants es dona a causa dels efluents d'EDAR, ja que actualment no existeixen tractaments per eliminar completament els contaminants de les aigües a tractar. La utilització d'aigua regenerada per al reg de camps agrícoles, com s'ha explicat anteriorment, també causa la incorporació d'aquests contaminants al sòl i posteriorment a les plantes.

La incorporació dels contaminants orgànics a les plantes depèn majoritàriament de tres factors, la concentració en el medi, la persistència del compost i la seva vida mitjana, $t_{1/2}$, (temps necessari per convertir el 50% del compost en una altra substància). Un compost que tingui una $t_{1/2}$ superior a 14 dies es suficientment estable per poder ser assimilat per les plantes (24).

Les tres vies principals a través de les quals els contaminants poden incorporar-se a la planta són (24):



- Incorporació radicular: els compostos entren a l'arrel amb el flux d'aigua i es mouen a través de la planta mitjançant la via apoplàstica (a través de les parets cel·lulars), la via simplàstica (a través del citoplasma de les cèl·lules) o la via transcel·lular (de vacúol en vacúol).
- Incorporació a partir de la fase de vapor que l'envolta: els dos processos responsables de que un contaminant volàtil que es troba al sòl es pugui incorporar a la planta són la volatilització del compost del sòl i la deposició de vapor en la superfície de la planta.
- Incorporació per difusió a través de les parts aèries: es poden incorporar a partir de deposició seca (molècules gasoses lliures o partícules de pols) o deposició humida (contaminants dissolts en aigua). Aquests compostos que es depositen a la superfície de la planta es poden introduir als lípids cuticulars i d'aquesta manera incorporar-se a través de la membrana lipídica, o poden incorporar-se a la planta en forma gasosa través dels estomes.

1.5 Estrès oxidatiu dels contaminants en les plantes

L'estrès oxidatiu es pot definir com el desequilibri entre oxidants i antioxidants en favor dels oxidants que condueixen a una alteració de la senyalització redox i el control i/o dany molecular (25).

Les espècies derivades d'oxigen que siguin agents oxidants i/o que es puguin convertir fàcilment en radicals reben el nom d'espècies reactives d'oxigen (ROS), tal com es detalla en la taula 4. Un radical lliure és un compost que conté un o més electrons desaparellats, capaç d'existir de forma independent i que en general és altament reactiu. És per això que tots els organismes aeròbics han de posseir un sistema de defensa antioxidant per protegir-se contra els danys induïts per ROS. Com antioxidant s'entén "qualsevol substància que, quan està present en baixa concentració comparat amb qualsevol altre substrat oxidable, preveu significativament l'oxidació d'aquell substrat" (26).

Com a conseqüència de participar en un metabolisme aeròbic, petites quantitats d'espècies amb oxigen reactiu (ROS) són generades constantment en l'organisme. S'hi poden incloure el radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), l'anió superòxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$), l'òxid nítric (NO) i el peròxid d'hidrogen (H_2O_2) (27). La

generació d'aquestes ROS no s'ha de relacionar sempre amb toxicitat. Les diverses funcions cel·lulars, com l'apoptosi i l'homeòstasi són fortament dependents del correcte balanç redox. Ocasionalment, es pot trobar un excés de ROS produït per factors endògens, com una malaltia o envelliment, o per factors exògens com la introducció de xenobiòtics (presència de PPCPs), la pol·lució, el tabac, pesticides i la radiació ultraviolada entre d'altres. Per tot això, els organismes vius han desenvolupat sistemes de defensa, enzimàtics i no-enzimàtics, per regular els nivells de totes les ROS (28).

Taula 4. Espècies reactives d'oxigen. Font: (28)

ROS		Símbol
Radicals	Anió superòxid	$O_2^{\cdot -}$
	Hidroxil	HO^{\cdot}
	Alcòxid	RO^{\cdot}
	Peròxid	ROO^{\cdot}
	Òxid nítric	NO^{\cdot}
No-radicals	Peròxid d'hidrogen	H_2O_2
	Àcid hipoclorós	$HClO$
	Ozò	O_3
	Oxigen singulet	$^1\Delta O_2$
	peroxinitrit	$ONOO^-$

1.6. Afectació de les clorofil·les per condicionants ambientals

Les clorofil·les es troben en totes les plantes que realitzen la fotosíntesi. La clorofil·la és el principal agent capaç d'absorbir l'energia lumínica i transformar-la en energia química per a la síntesi dels compostos orgànics necessaris per la planta. Les fulles de la majoria de les plantes deuen el seu color verd a la clorofil·la, encara que a causa de l'envelliment biològic aquestes van desapareixent per deixar pas a altres pigments com els carotenoides, provocant un canvi de color en els vegetals.

Originalment, s'anomenava clorofil·les als pigments involucrats en la fotosíntesi de les plantes superiors, però actualment s'utilitza per a definir tots els pigments fotosintètics amb estructura de porfirines. L'estructura de la molècula clorofil·la consta de dues parts: un anell de porfirina i una cadena llarga anomenada fitol.

Existeixen varies clorofil·les: clorofil·les a, b, c, d i bacterioclорofil·les a, b, c, d i e. Les clorofil·les principals són la a i la b, que normalment es troben en una relació a:b (3:1). La diferència entre les dos clorofil·les principals és que la clorofil·la b té un grup formil que substitueix una de les cadenes metil laterals, mentre que la clorofil·la a té un metil en aquesta posició (Figura 7).

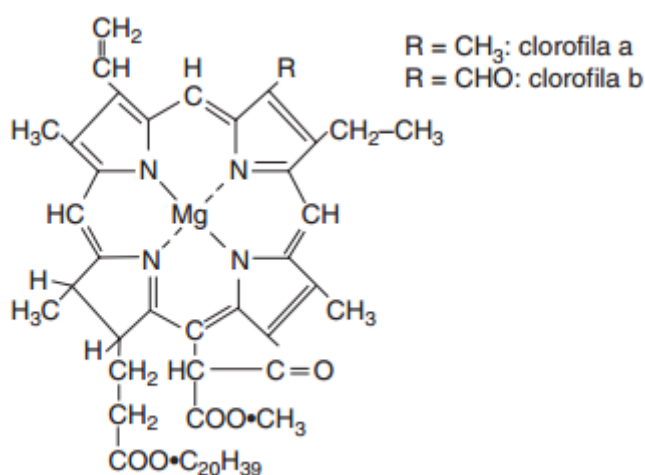


Figura 7. Estructura de les clorofil·les a i b. Font: (29)

Les clorofil·les es localitzen als cloroplasts de les fulles i estan unides a lípids, proteïnes, lipoproteïnes i, a vegades, a carotenoides. Aproximadament, el contingut de clorofil·la a les fulles verdes està al voltant de 0,1% en base humida, tot i que varia depenent del seu estat de maduresa.

La variació de la concentració de clorofil·les es una manera de mesurar la qualitat dels vegetals verds, que ha pogut disminuir a causa de la temperatura, el pH, la llum o la presència de contaminants. Tal com s'observa a la figura 8, l'alteració més comuna en la degradació de clorofil·les és la feofitització, que és la substitució del magnesi per hidrogen en l'anell de porfirina donant lloc a la formació de feofitines a i b. Les clorofil·lites es formen per la eliminació del grup fitol; tenen les mateixes característiques espectrals que la clorofil·la i són més solubles en aigua. L'eliminació del magnesi d'aquestes molècules produeix la formació de feofòrbid hidrosoluble amb les mateixes característiques espectrals que la feofitina. Aquesta degradació produeix un canvi de color en els vegetals, que és rebut pel consumidor com una pèrdua de qualitat (29).

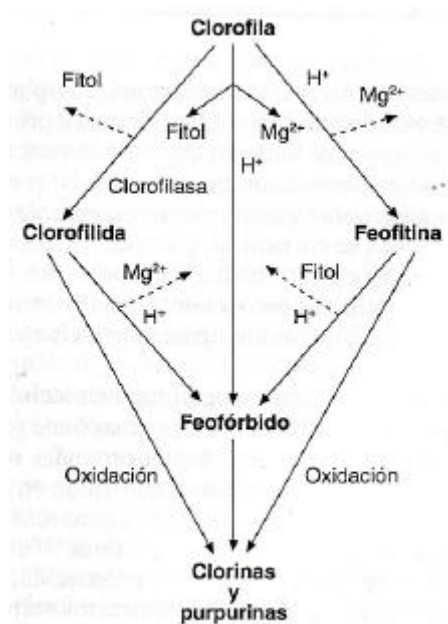


Figura 8. Degradació química de les clorofil·les. Font: (30)

1.7. Incorporació de contaminants a la cadena alimentària. Impacte a la salut

Els PPCPs presents en el medi ambient poden desencadenar reaccions toxicològiques a causa d'una exposició a llarg termini a concentracions baixes en organismes aquàtics i terrestres (31). Es complica avaluar l'efecte perjudicial de manera individual dels contaminants, ja que normalment es troben barrejats en el medi ambient. Habitualment, aquests contaminants es troben en els residus i en aigües superficials i subterrànies en concentracions molt baixes, de ng/L a µg/L, per això el que pren més importància és la seva activitat biològica i la seva contínua descàrrega en el medi per diferents vies, que provoca que siguin pseudo-persistentes (32,33).

El problema es magnifica quan aquests productes farmacèutics absorbits en el sòl poden ser captats per les plantes i d'aquí passar a la cadena alimentària (31). D'aquesta manera, espècies que habitualment no tindrien un contacte directe amb els compostos, es veuen sotmeses a una exposició indirecta a causa de l'alimentació de plantes i/o animals amb aquestes substàncies incorporades.

Els dos efectes perjudicials més preocupants són la resistència a antibiòtics i la disrupció endocrina.

- Resistència antibiòtica

Des de fa molts anys s'han creat molts agents antimicrobians sintètics o semi-sintètics amb el propòsit de controlar el major nombre possible de malalties infeccioses. La utilització d'aquests antibiòtics, tant en medicina humana com veterinària, sense cap control, ha provocat un augment de bacteries resistents. Hi ha bacteries que no són afectades per cap antibiòtic, ja sigui perquè no tenen lloc d'acció o perquè són inaccessibles. Aquesta situació s'anomena resistència natural. Per altra banda existeix la resistència adquirida, que consisteix en que hi ha espècies que són sensibles als antibiòtics, però en determinats moments s'aïllen variants que no ho són i que creixen en presència de l'antibiòtic.

Hi ha una major possibilitat de creació de bacteries resistents quan estan sotmeses a una exposició prolongada a antibiòtics però a dosis amb les que no s'aconsegueix un determinat efecte terapèutic (baixes). Això es degut a que aquestes concentracions són suficientment baixes per millorar el

creixement de les bactèries resistents i el suficientment altes per exercir una pressió selectiva que afavoreixi les soques resistents. Aquest tipus de resistència és molt estable (24).

- Disrupció endocrina

Un disruptor endocrí es defineix com una substància exògena o una barreja de substàncies que alteren la funció o funcions del sistema endocrí i, conseqüentment, produeix efectes adversos per la salut d'un organisme intacte, o en la seva descendència o subpoblacions. Aquests compostos simulen i/o antagonitzen a les hormones endògenes, provocant efectes negatius en la reproducció d'organismes, afectant a la supervivència i existència de poblacions completes. Una gran quantitat de PPCPs, com el 17 α -etinilestradiol, poden induir canvis en la reproducció de peixos (24).

- Altres efectes

Aquest tipus de contaminants poden produir molts altres efectes, com són: bioactivitat directa dels fàrmacs i/o dels seus metabòlits principals que pot redundar a promoure efectes ecotoxicològics aguts o crònics en organismes aquàtics o terrestres, alteració de microcosmos bacterians (afectant l'activitat dels bacteris nitrificants i per tant el cicle del N), propietats insecticides secundàries i intersexualitat en organismes aquàtics, que pot provocar, per exemple, la feminització dels alevins d'algunes espècies sensibles de peixos (salmó) (15).

1.8. Context del treball

Aquest treball forma part d'un projecte del tipus "Proyectos de Investigación Fundamental No Orientada (2012-2014)" finançat pel Ministerio de Economía y Competitividad. El projecte es titula: ***Estudio de la transferencia de contaminantes orgánicos emergentes del agua de riego a hortalizas. Efecto de biochars y nanopartículas en su biodisponibilidad.*** El seu codi de referència és: CGL2011-24844.

L'investigador principal del projecte és el Dr. Josep M. Bayona i s'està duent a terme entre el CSIC-IDAEA i la UPC.



La part experimental de camp es va realitzar a Agròpolis, la finca experimental de l'ESAB-UPC, les anàlisis de clorofil·les a la Unitat d'Anàlisi de l'ESAB i les corresponents a avaluar l'estrès oxidatiu en les dependències del IDAEA.

OBJECTIUS



2. Objectius

2.1. Objectiu general

L'objectiu general d'aquest treball final de grau és determinar si la incorporació de biochar en un sòl permet reduir els possibles efectes de toxicitat en el cultiu de *Lactuca sativa* L. (cv. Meravella) produïts per la presència de contaminants orgànics emergents en l'aigua de reg.

2.2. Objectius específics

Per assolir aquest objectiu general calen definir els següents objectius específics en relació a l'addició de biochar en el sòl i a la incorporació de contaminants emergents en l'aigua de reg:

- Determinar la biomassa produïda.
- Relacionar les lectures d'SPAD i la concentració de clorofil·les..
- Avaluar els continguts de clorofil·les a, b i totals.
- Quantificar l'estrès oxidatiu en les plantes.
- Validar el mètode analític utilitzat per a la determinació de l'estrès oxidatiu en les plantes.

MATERIALS I MÈTODES

3. Materials i mètodes

3.1. Material vegetal

El material vegetal utilitzat en aquest treball va ser *Lactuca sativa* L. del tipus varietal Meravella. El cultivar en concret utilitzat va ser Meravella Arena de l'empresa Vilmorin (Figura 9). El planter emprat per a iniciar el treball va ser adquirit a l'empresa Planters Lladó. El total d'unitats adquirides va ser de 40, de les quals 20 van ser utilitzades en el nostre assaig i les altres 20 van ser destinades per un altre assaig vinculat al nostre, però definit amb uns altres objectius.



Figura 9. Planter d'enciam varietal Meravella utilitzat per a iniciar el treball (esquerra) i planta adulta (dreta)

3.2. Característiques del sòl i solució nutritiva

El sòl utilitzat en l'experiment va ser recollit de l'horitzó superficial d'un sòl Typic Xerorthents de la superfície agrícola del delta del riu Llobregat (long. = 2º 30' E, lat.=41º 17' N). Les característiques principals d'aquest sòl es detallen a la taula 5:

Taula 5. Característiques fisicoquímiques del sòl

Textura	Arena (90% de sorra, 8% de llim i 2% d'argila)
pH	8,12
Conductivitat elèctrica (CE)	3,8 dS/m
Carboni orgànic total	5 g/kg
N total	0,7 g/kg
P	29 mg/kg
Capacitat d'intercanvi catiònic (CIC)	3,8 meq/100g
Ca ²⁺	2,82 meq/100g
Mg ²⁺	0,64 meq/100g
Na ⁺	0,25 meq/100g
K ⁺	0,15 meq/100g

La solució nutritiva utilitzada per regar va ser la de Hoagland and Arnon (34).

3.3. Disseny de l'experiment

3.3.1. Biochar

Per a realitzar l'experiment es disposava de tres tipus de biochars (BC_450, BC_650, BC_750) produïts a "Bodegas Torres" (Vilafranca del Penedès) a partir de fusta de cep. El número de cada tipus de biochar determina la temperatura amb la qual van ser produïts. Per a realitzar l'experiment es va seleccionar el BC_650, ja que és el que presentava una àrea superficial més elevada. Aquesta



característica és molt important pel que fa a la retenció de compostos, ja que una àrea superficial molt elevada fa que els compostos quedin incorporats al biochar i estiguin menys biodisponibles a les plantes. A més, interessa que la relació elemental (H/C) tingui un valor baix, ja que indica que la superfície del biochar serà més aromàtica i augmentaran les interaccions que poden haver-hi amb els contaminants. En la taula 6 es poden observar les característiques de cada tipus de biochar.

Taula 6. Propietats dels tres biochars disponibles (B.E.T (Brunauer-Emmett-Teller): model matemàtic per a la mesura de superfície específica; BJH (Barret-Joyner-Halenda): mètode per al càlcul de distribucions de mida del porus; 4V/A: 4 vegades el volum entre l'àrea)

	BC_450	BC_650	BC_750
N₂-B.E.T. àrea superficial (m²g⁻¹)^a	2,01	387	326
Volum de porus (cm³g⁻¹)	0,0049	0,0679	0,0304
BJH desorció volum acumulat de porus			
Mida de porus (nm)			
BJH desorció mitjana de diàmetre de porus (4V/A)	26,36	3,257	3,043
C (%)	64,74	62,84	73,17
H (%)	3,08	1,12	1,18
N (%)	0,42	0,33	0,60
S (%)	<0,10	<0,10	<0,10
H/C elemental	0,57	0,21	0,19

^aBasat en Brunauer-Emmett-Teller ajustat a la isoterma d'adsorció de N₂ a 77 K.

3.3.2. Contaminants

En el desenvolupament de l'experiment es van afegir una sèrie de contaminants en el sòl utilitzat. A continuació es donen algunes característiques de cada contaminant utilitzat (Taula 7).

Taula 7. Contaminants utilitzats en l'assaig

Nom del contaminant	Casa comercial	Riquesa (%)	Referència
Triclosan (TCS)	Fluka	97	72779
Bisfenol A (BPA)	Sigma Aldrich	99	23965-8
Ibuprofè (IBU)	Sigma Aldrich	99	14883
Cafeïna (CAF)	Sigma Aldrich	99	C5-3
Carbamazepina (CBZ)	Sigma Aldrich	99	30948-6
Tonalida (TON)	Ventós	97	-
Àcid clofíbric (CFA)	Sigma Aldrich	99	90323
Furosemida (FUR)	Sigma Aldrich	98	F4381
Metil dihidrojasmonat (MDHJ)	Sigma Aldrich	96	59677
Sulfametazina (SMT)	Sigma Aldrich	99	S6256
Hidroclorur de propranolol (PROP)	Sigma Aldrich	99	P0884
Tris(2-cloroetil)fosfat (TCEP)	Sigma Aldrich	97	119660
17 α -Etinilestradiol (EES)	Sigma Aldrich	98	E4876

3.3.3. Distribució i dosificació dels contaminants i biochar en els contenidors

Per avaluar l'efecte del biochar sobre l'adsorció de contaminants orgànics emergents es va dissenyar un experiment que comprenia 4 tractaments i 10 rèpliques. El nombre de rèpliques mostrejades per a avaluar l'assaig va ser de 5 per tractament.

Els tractaments establerts van ser definits a partir de les variables que es volien estudiar (presència o no de biochar en el sòl i addició o no de contaminants emergents). En total el nombre de tractaments va ser de 4 (Figura 10).

- T0 → Control (ni biochar ni contaminants emergents)
- T1 → Addició de contaminants emergents
- T2 → Presència d'un 2,5% de biochar en el sòl i addició de contaminants emergents
- T3 → Presència d'un 5% de biochar en el sòl i addició de contaminants emergents

La quantitat de biochar aportada al sòl acostuma a dependre del tipus de sòl, però normalment s'utilitza una aportació d'un 1%. En aquest estudi, per poder avaluar més clarament l'efecte del biochar es van escollir unes concentracions més elevades (2,5% i 5%). Encara que no hi ha referències bibliogràfiques sobre aquestes quantitats aportades es fa aquesta primera prova per orientar futures investigacions.

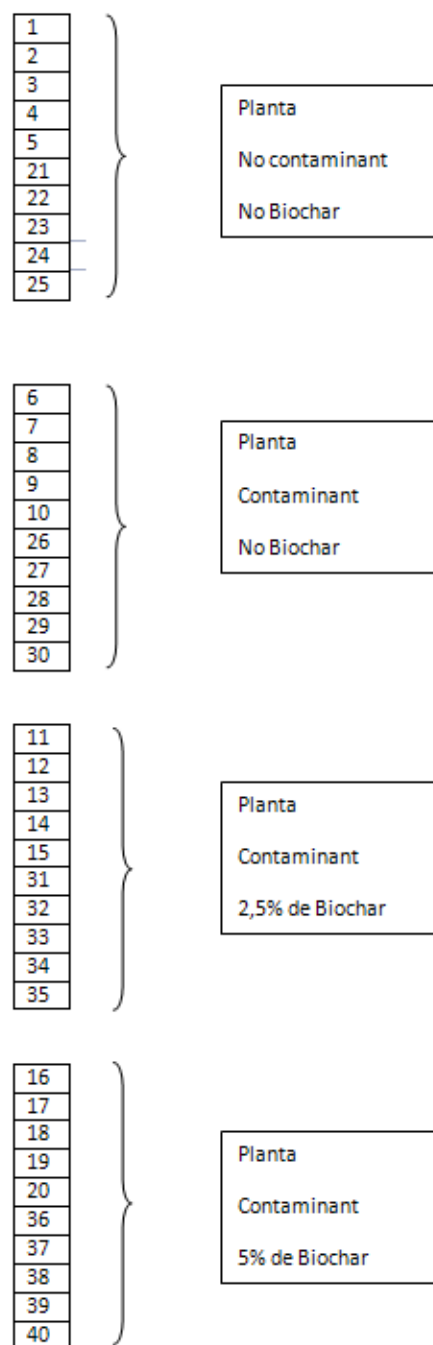


Figura 10. Distribució del biochar i contaminants en els contenidors

El material vegetal es va ubicar en contenidors cilíndrics de vidre de color àmbar (ampolles invertides de vidre sense base) d'aproximadament 2,5 L de volum (diàmetre= 15 cm, alçada= 20

cm). Aquests contenidors es van distribuir en dues files de 20. La quantitat de sòl afegit, una vegada passat per un sedàs de 2 mm, a cada contenidor va ser de 2,3 Kg.

El sòl dels tractaments T1, T2 i T3 van ser addicionats amb una combinació de 10 contaminants emergents. Els contaminants emergents van ser directament suplementats en el contenidor per tal d'evitar una possible absorció d'aquests productes pel sistema de reg. Després de cada incorporació de contaminants es realitzava un reg. Es va escollir una concentració de contaminants que permetés detectar-los als diferents compartiments (sòl, arrel i fulla), ja que tot i que no era el tema d'estudi d'aquest treball, l'experiment també formava part d'un altre projecte on s'analitzava els contaminants emergents en cada tipus de compartiment.

La dosificació del contaminants, tal com es detalla a la figura 11, per un contaminant emergent, es va realitzar de la següent manera:

Els patrons de BPA, CAF, CBZ, CFA, FUR, MDHJ, IBU, TON, TCS, TCEP, SMT i PROP eren de 5000 µg/mL (es van pesar 50 mg en 10 mL de metanol) i el de EES era de 2500 µg / mL (25 mg en 10 mL de metanol). Per tant, es van pipetejar 1 mL de BPA, CAF, CBZ, CFA, FUR, MDHJ, IBU, TON, TCS, TCEP, SMT i PROP i 0,5 mL d'EES i es van portar a 50 mL de metanol (concentració aproximada de 100). D'aquesta dissolució es van dissoldre 4,4 mL en 50 mL de metanol. Cada dia de reg, es van pipetejar 1 mL d'aquesta dissolució (concentració aprox 8,8 ppm) i es van suplementar als contenidors. Posteriorment, es va posar en funcionament el reg, fet que va provocar que els contaminants es dissolguessin amb 66,6 mL d'aigua, el que dona una concentració final per cada analit de 132 ng/mL. Tenint en compte el volum total de reg, s'obté una concentració final de 15 ng/mL.

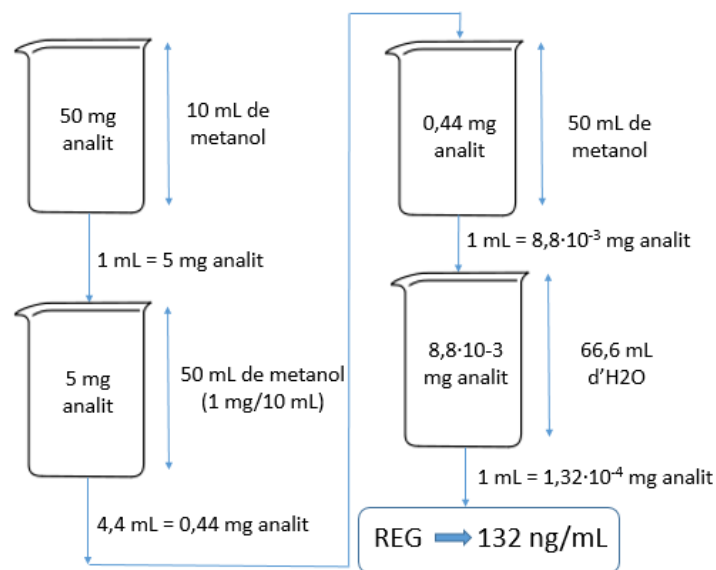


Figura 11. Dosificació dels contaminants

3.3.4. Procediment de muntatge

El procediment de muntatge de l'experiment que es va dur a terme va ser el següent:

1. Neteja i enumeració de tots els contenidors.
2. Col·locació d'un filtre de llana de roca a la part inferior del test per tal d'evitar l'escapament del sòl.
3. Ompliment dels contenidors amb el sòl (amb o sense biochar).
4. Ubicació dels contenidors sobre suports d'acord amb el sorteig aleatori.
5. Plantació dels enciams.
6. Col·locació de les ampolles per a la recollida de l'aigua de drenatge.
7. Col·locació dins de cada contenidor del sistema de reg per degoteig.

En la figura 12 es pot observar el resultat final de tot el procediment de muntatge.



Figura 12. Resultat final de procediment de muntatge

3.3.5. Ubicació dels contenidors amb els tractaments establerts

Com ja s'ha comentat anteriorment, la localització de les 40 plantes va ser escollida a l'atzar, ja que la radiació solar que arribava podia ser lleugerament diferent segons la ubicació. Aquest fet, podria ser causant d'alguna diferència en el seu creixement i en la concentració de clorofil·les. En la figura 13 s'observa la col·locació final de les plantes.

Finestra	
6	5
18	3
11	17
22	25
2	33
40	37
39	4
35	26
21	8
27	28
34	31
12	30
13	32
20	15
24	16
23	14
10	36
29	9
19	7
38	1
Passadís	

Figura 13. Ubicació dels contenidors amb els tractaments establerts

3.3.6. Duració i condicions de cultiu

La durada de l'assaig va ser de 56 dies. El treball experimental es va iniciar el dia 23/10/2014 i va finalitzar el dia 17/12/2014.

Tot l'assaig es va desenvolupar sota condicions d'hivernacle de vidre.



3.3.7. Reg

Durant l'assaig, el nombre de regs aplicats al cultiu van ser 28. La dosi d'irrigació per contenidor va ser de 100 mL/reg, el que dóna una aportació d'aigua total de 2800 mL.

Els dies en els que es va realitzar aplicació de contaminants, el reg es va distribuir en 66,6 mL al matí i 33,3 mL a la tarda. L'aplicació de contaminants es va dur a terme en el reg del matí i es va realitzar 8 vegades en dies diferents, el que fa un volum total d'aplicació de contaminants de 70 µg addicionats en 533 mL d'aigua de reg d'un total de 2800 mL (Figura 11).

Els contaminants orgànics utilitzats són poc hidrosolubles, i per tant, abans de ser incorporats en el sistema de reg s'han de dissoldre amb un alcohol. Per reduir la quantitat de metanol a afegir, es van agafar 66,6 mL d'aigua i es va afegir 1 mL d'una dissolució més concentrada (8800 ng/mL) per tal d'obtenir després de la dilució una concentració final de 132 ng/mL. Tenint en compte el volum total afegit als enciams, la concentració d'irrigació és de 15 ng/mL. També, al saber que la quantitat de contaminant afegit (70 µg) i que cada contenidor tenia aproximadament 2,3 kg de sòl o sòl adobat amb biochar, la concentració aplicada en sòl és de 30,4 µg/kg.

En cada aplicació de contaminants s'havia de regar 30 mostres (n'hi havia 40, 10 sense BC ni contaminants, 10 sense BC amb contaminants, 10 amb 2,5 % BC i contaminants i, per últim, 10 amb 5 % BC i contaminants). Llavors, es van necessitar: 30 mL x 8 dies = 240 mL de dissolució 8800 ng/mL.

La planificació del reg és la següent:

23/10/2014 → Es planten 40 unitats d'enciam Meravella amb 2,3 – 2,4 kg de sòl i 0, 2,5 i 5 % p/p de Biochar.

18/11/2014 → Es prepara el mix de contaminants

19/11/2014 → Es comença a regar amb contaminants. El reg diari és de 99,9mL, 66,6 a les 9h i 33,3 a les 15h.

21/11/2014 → Segon reg

25/11/2014 → Tercer reg

27/11/2014 → Quart reg

02/12/2014 → Cinquè reg

09/12/2014 → Sisè reg

12/12/2014 → Setè reg

15/12/2014 → Vuitè reg

17/12/2014 → Fi de l'assaig i recol·lecció del material vegetal (5 plantes a l'atzar per tractament, que dóna una total de 20 plantes).

3.4. Determinació de la biomassa

Per a estimar la biomassa es va determinar el pes fresc de la part aèria dels enciams i el pes fresc i sec de les arrels.

La determinació del pes fresc de les fulles (part aèria dels enciams produïts) es va dur a terme al final de l'assaig, en el moment de desmuntar l'experiment en el propi hivernacle (Figura 14).

El material vegetal (part aèria i arrels), correctament identificat, es va portar al laboratori de Fitotècnia de l'ESAB per tal de posar-lo a l'estufa i així determinar-ne els pesos secs. El material va romandre dins d'una estufa 80°C fins a obtenir pesos constants.



Figura 14. Aspecte dels enciams en el moment final de l'assaig experimental a Agròpolis

3.5. Reactius utilitzats en la part experimental

- N,N-dimetilformamida
- Àcid tricloroacètic (TCA)
- Tampó de fosfat (pH=7) utilitzant fosfat disòdic (Na_2HPO_4) i fosfat monosòdic (NaH_2PO_4)
- Iodur potàssic (KI)
- Peròxid d'hidrogen (H_2O_2)
- Aigua desionitzada obtinguda amb un equip Milli-Q Plus (Millipore)

3.6. Determinació de les clorofil·les

3.6.1. Estima de les clorofil·les amb l'aparell SPAD OPTI-SCIENCES CCM-200

a) Clorofil·les i plantes d'enciam experimental experimental

L'estima de la concentració de clorofil·les es va realitzar amb l'SPAD (Figura 15). Les lectures amb l'SPAD es van realitzar en tres posicions diferents de fulles (posicions: exterior, mig, interior). De cada posició es van fer 3 lectures per planta. Aquest procediment es va dur a terme per a totes les plantes de l'experiment. Els valors obtinguts amb aquest aparell són absorbàncies, que posteriorment es poden comparar amb valors obtinguts fent una extracció de clorofil·les i determinant-ne el seu contingut mitjançant tècniques espectrofotomètriques.

b) Clorofil·les i plantes d'enciams patró

Degut a que el material vegetal experimental va ser tot ell utilitzat per a determinar la biomassa, posteriorment es va adquirir en el mercat enciams de la mateixa varietat per tal d'establir una relació entre els valors donats per l'SPAD i el contingut real en clorofil·les. Es van prendre valors d'absorbància amb l'SPAD en diferents parts (cinc rèpliques agafades en fulles de la part exterior, cinc de fulles intermitges i cinc de fulles interiors) dels dos enciams comprats en el mercat. En el moment de realitzar les lectures, es va marcar amb un retolador el lloc exacte de la mesura i el número de lectura, per poder realitzar una extracció posterior dels mateixos

punts per tal de determinar-ne exactament la concentració de clorofil·les mitjançant tècniques espectrofotomètriques.



Figura 15. Aparell SPAD per a la mesura de clorofil·les. Font: (35)

3.6.2. Extracció de clorofil·les

L'extracció de clorofil·les es va realitzar a partir de dos plantes d'enciams de la mateixa varietat que les de l'experiment, comprades al mercat.

Les mostres d'enciam tenien una àrea foliar de forma circular de $1,77 \text{ cm}^2$. Aquestes mostres van ser preses dins de les marques realitzades en el moment de fer els mesuraments òptics amb l'SPAD i correctament numerades.

El procediment d'extracció de les clorofil·les es va fer amb N,N-dimetilformamida (36). Les 30 mostres obtingudes (5 punts per 3 posicions per 2 plantes) es van tallar amb un trepasuro i es van col·locar en vials, tapats amb paper d'alumini, que contenien 5 mL de N,N-dimetilformamida, tal com s'observa en la figura 16. A continuació, els vials es van mantenir a la foscor i refrigerats (4°C) durant 48 hores, per tal d'obtenir una extracció completa.



Figura 16. Extracció de clorofil·les

3.6.3. Quantificació de les clorofil·les

L'absorbància dels extractes es va mesurar a 647 nm i a 664,5 nm amb l'espectrofotòmetre que s'observa en la figura 17 (36). La concentració de clorofil·les es va determinar amb els coeficients d'extinció d'Inskeep i Bloom (37). El contingut de clorofil·les es va calcular mitjançant l'ús de l'àrea foliar del disc i mitjançant el pes sec de la fulla (Figura 18).



Figura 17. Espectrofotòmetre utilitzat per la quantificació de clorofil·les



Figura 18. Determinació del pes sec dels discs

En la taula 8 s'observa els coeficients d'extinció d'Inskeep i Bloom, amb els quals es possible obtenir la quantitat de clorofil·les que conté cada disc.

Taula 8. Equacions simultànies per quantificar Clorofil·les en teixit vegetal a partir de valors d'absorbància (A) utilitzant cubetes d'1 cm. Font: (37)

80 % Acetona	DMF
Clorofil·la B = $(20.47 * Abs^{647\ b}) - (4.73 * Abs^{664.5})$	Clorofil·la B = $(20.70 * Abs^{647}) - (4.62 * Abs^{664.5})$
Clorofil·la A = $(12.63 * Abs^{664.5}) - (2.52 * Abs^{647})$	Clorofil·la A = $(12.70 * Abs^{664.5}) - (2.79 * Abs^{647})$
Clorofil·les totals = $(17.95 * Abs^{647}) - (7.90 * Abs^{664.5})$	Clorofil·les totals = $(17.90 * Abs^{647}) - (8.08 * Abs^{664.5})$
^a Totes les clorofil·les en mg/L. ^b A_{647} = absorbància a 647 nm (màxima per clorofil·la b); $A_{664,5}$ = absorbància a 664,5 nm (màxima per clorofil·la a)	

3.7. Tractament estadístic i programari

Es va realitzar un tractament estadístic dels resultats obtinguts de biomassa fresca i seca, tant d'arrels com de fulles, i de clorofil·les a, b i totals. Aquest tractament va consistir en realitzar un anàlisi de la variància (ANOVA) amb un nivell de significància del 5% per a observar si hi havia diferències significatives entre tractaments (valor p menor o igual a 0,05). L'obtenció d'un resultat significant en un ANOVA indicava que almenys un grup diferia dels altres. En aquests casos, es realitzava un test LSD, que consistia en fer agrupacions segons les diferències.

Per dur a terme aquest tractament estadístic es va emprar el programari R.

3.8. Determinació de l'estrès oxidatiu

En el laboratori d'IDAEA-CSIC es van determinar els nivells de peròxid d'hidrogen d'acord amb el mètode del grup de Sergiev (38).

a) Procediment de muntatge

El procediment per obtenir els nivells de peròxid d'hidrogen és el següent i es pot observar en les imatges de la figura 19 (38):

- Triturar el teixit de fulles d'enciam utilitzant nitrogen líquid i picadora.
- Pesar 500 mg de teixit de fulla.
- Homogeneïtzar en bany de gel amb 5 mL 0,1% (w/v) TCA.
- Centrifugar homogeneïtzat durant 15 min a 12000 x g i a una temperatura de 4 °C.
- Afegir 0,5 mL del sobrenedant a 0,5 mL 10mM de fosfat de potassi tampó (pH=7) i a 1 mL 1M de KI.
- Mesurar l'absorbància del sobrenedant a 390 nm.
- Extreure els valors de cada mostra a partir d'una recta de regressió.

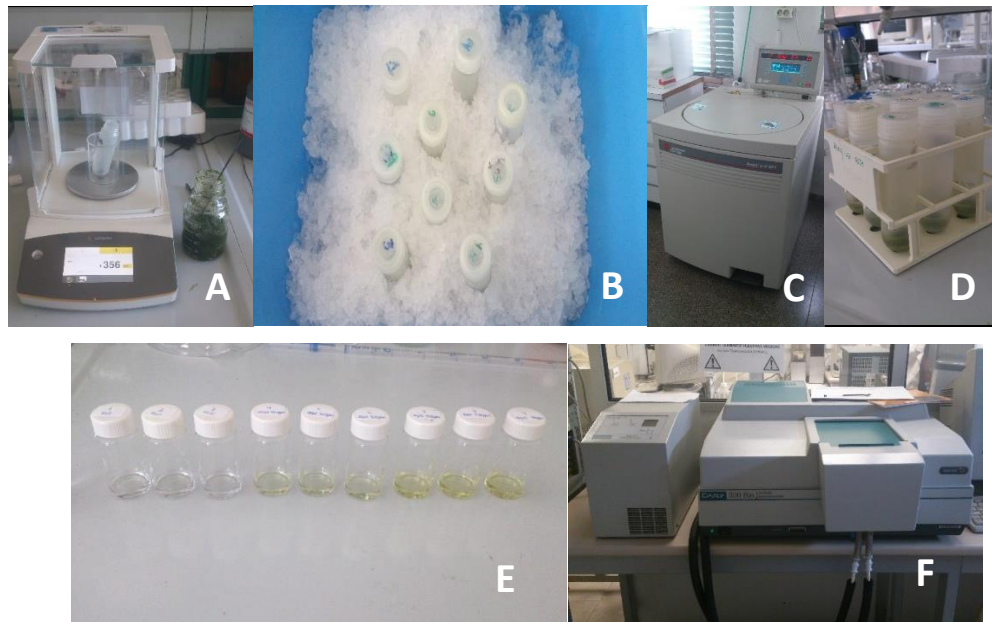


Figura 19. Procediment per determinar l'estrès oxidatiu; (A: pesada del teixit vegetal, B: homogeneïtzació, C: ultracentrifugació, D: mostres centrifugades, E: addició de reactius al sobrenedant, F: mesura d'absorbància amb espectrofotòmetre)

b) Reactius utilitzats

Els reactius utilitzats per a determinar l'estrès oxidatiu van ser:

- KI: iodur potàssic
- TCA: àcid tricloroacètic
- KH_2PO_4 : fosfat de potassi

c) Preparació de solucions

A continuació, es detallen les solucions que es van haver de preparar per a realitzar el procediment de determinació de l'estrès oxidatiu.

KI: 100 mL 1 M → Per a preparar aquesta solució cal pesar 16,6 g de KI i dissoldre'ls en 100 mL d'aigua MilliQ.

$$0.1 \text{ L solució} \times \frac{1 \text{ mol KI}}{1 \text{ L solució}} \times \frac{166 \text{ g KI}}{1 \text{ mol KI}} = 16.6 \text{ g KI}$$

Na₂HPO₄: 100 mL 0,01 M (basic) → Per a preparar aquesta solució cal pesar 270 mg de Na₂HPO₄ 7H₂O i dissoldre'ls en 100 mL d'aigua MilliQ.

$$\begin{aligned} 0,1 \text{ L solució} &\times \frac{0,01 \text{ mol Na}_2\text{HPO}_4}{1 \text{ L solució}} \times \frac{1 \text{ mol Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}}{1 \text{ mol Na}_2\text{HPO}_4} \\ &\times \frac{268,07 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}}{1 \text{ mol Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} = 0,27 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \\ &= 270 \text{ mg Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \end{aligned}$$

NaH₂PO₄: 100 mL 0,01 M (àcid) → Per a preparar aquesta solució cal pesar 138 mg de NaH₂PO₄ H₂O i dissoldre'ls en 100 mL d'aigua MilliQ.

$$\begin{aligned} 0,1 \text{ L solució} &\times \frac{0,01 \text{ mol NaH}_2\text{PO}_4}{1 \text{ L solució}} \times \frac{1 \text{ mol NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}}{1 \text{ mol NaH}_2\text{PO}_4} \\ &\times \frac{137,99 \text{ g NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}}{1 \text{ mol NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}} = 0,138 \text{ g NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} \\ &= 138 \text{ mg NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} \end{aligned}$$

Tampó pH=7 → Per preparar la solució tampó cal barrejar 60 mL NaH₂PO₄ + 40 mL Na₂HPO₄

TCA: 250 mL 0,1% w/v → Per a preparar aquesta solució cal pesar 250 mg de TCA i dissoldre'ls en 100 mL d'aigua MilliQ.

$$250 \text{ mL solució} \times \frac{0.1 \text{ g TCA}}{100 \text{ mL solució}} = 0.25 \text{ g TCA} = 250 \text{ mg TCA}$$

d) Preparació de la solució d'H₂O₂

La solució inicial d'H₂O₂ era de 300000 ppm i es van fer una sèrie de dilucions (Figura 20) per aconseguir solucions d' H₂O₂ de 1500 ppm, 500 ppm i 250 ppm. Totes les dilucions es van enrasar amb aigua MilliQ.

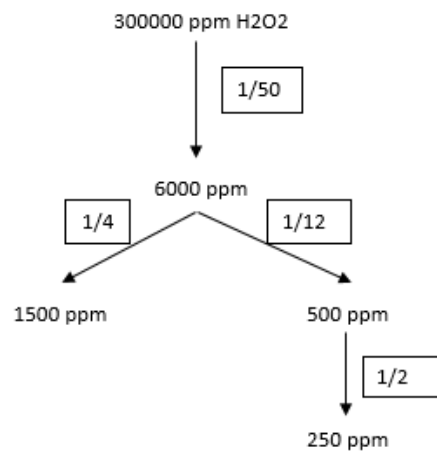


Figura 20. Dilucions de la solució d'H₂O₂

e) Realització de la recta de regressió patró

La recta de regressió patró es va dur a terme amb diferents dilucions per tal de tenir diferents nivells d'H₂O₂, tal com s'observa en la figura 21.

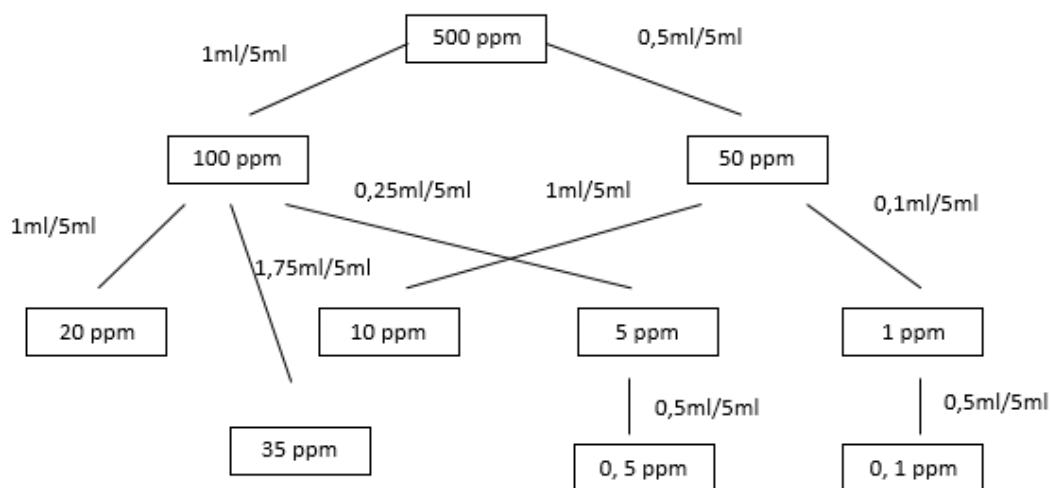


Figura 21. Dilucions realitzades per a la realització de la recta de regressió patró

3.9. Avaluació del mètode per a determinar estrès oxidatiu

Un mètode analític és un procediment que obté uns resultats a partir de l'anàlisi química de mostres. Abans d'utilitzar-lo, és necessari comprovar que compleix uns determinats requisits depenent de l'aplicació per a la que es vol utilitzar. Aquest procés de verificació es coneix amb el nom de validació i ha d'establir les característiques de funcionament i les limitacions del mètode, així com identificar les influències que poden canviar aquestes característiques. En aquest cas, s'ha utilitzat l'exactitud, el límit de quantificació i el límit de detecció com a paràmetres per verificar la qualitat del mètode analític.

- Exactitud

L'exactitud mostra la proximitat entre el resultat obtingut per un mètode i el valor real o esperat. S'expressa en tant per cent i es calcula fent el quocient entre la mitjana de totes les mesures i el valor real o esperat.

- Límit de detecció (LOD)

Aquest paràmetre està relacionat amb la sensibilitat del mètode. El límit de detecció (LOD) es defineix com la quantitat d'analit present que es deriva de la menor senyal analítica que pot detectar-se amb certesa raonable (Y_{LOD}). Si s'analitza un blanc de la mostra varies vegades i s'obté la senyal mitjana (\bar{Y}_0) i la desviació estàndard ($S_{\bar{Y}_0}$), les senyals majors a $Y_{LOD} = \bar{Y}_0 \pm 3 S_{\bar{Y}_0}$ caurien fora de la gaussiana del blanc analit i es podrien assignar a la presència d'analit. Si es té una recta de calibratge d'equació $y = bx + a$, el LOD es calcula com:

$$X_{LOD} = \frac{Y_{LOD} - a}{b}$$

La senyal del blanc ha de coincidir amb la ordenada del blanc analític (donat que és la senyal que s'obtindria a una concentració d'analit igual a zero), el LOD es calcula com:

$$X_{LOD} = \frac{3 \times S_a}{b}$$

Sent S_a la desviació estàndard de l'ordenada.

- Límit de quantificació (LOQ)

Igual que el límit de detecció també està relacionat amb la sensibilitat del mètode. El límit de quantificació (LOQ) es defineix com la quantitat d'analit present derivada de la menor senyal analítica que pot ser mesurada amb precisió i exactitud. Igual que el paràmetre LOD. La IUPAC proposa com LOQ al valor $Y_{LOD} = \bar{Y}_0 \pm 10 S_{\bar{Y}_0}$, que porta a una concentració a partir de la recta de calibratge: (39)

$$X_{LOQ} = \frac{10 \times S_a}{b}$$

RESULTATS

4. Resultats

4.1. Resultats en la determinació de la biomassa

En la taula 9 i la figura 22 es poden observar els promitjos i les desviacions estàndards dels resultats obtinguts de biomassa fresca i seca determinada a les fulles i a les arrels per a cadascun dels 4 tractaments. L'anàlisi estadística d'aquests resultats indica que l'addició de contaminants emergents en l'aigua de reg afecta a la quantitat de biomassa produïda, tant a nivell de fulles com de formació d'arrels. La incorporació de biochar en el sòl no ha contribuït, en general, a contrarestar l'efecte de la presència d'aquests contaminants. Cal senyalar que entre el tractament 2 (addició de contaminants amb presència d'un 2,5% de biochar en el sòl) i el control no es van donar diferències significatives pel que fa a la variable del pes fresc de les fulles. No obstant, cal indicar que pel que fa al pes sec de les fulles es detecta, en valors absoluts, una tendència a augmentar el pes a mesura que augmenta la concentració de biochar. En les arrels, aquest comportament no es detecta.

Taula 9. Resultats de la determinació de la biomassa amb un nivell de significança del 5% (0: Control; 1: Contaminant/no biochar; 2: Contaminant/2.5% biochar; 3: Contaminant/5% biochar; P.F.F: pes fresc fulles; P.S.F: pes sec fulles; P.S.A: pes sec arrels) (Els promitjos que continguin la mateixa lletra no són significativament diferents)

Tractament	P.F.F (g)	P.S.F (g)	P.S.A (g)
0	181,2 ± 40,521 a	10,14 ± 1,494 a	1,3 ± 0,238 a
1	137,5 ± 18,138 b	6,925 ± 0,508 b	0,9 ± 0,258 b
2	149,2 ± 11,278 ab	7,18 ± 0,579 b	0,84 ± 0,146 b
3	148,0 ± 13,491 b	7,38 ± 0,920 b	0,7 ± 0,185 b

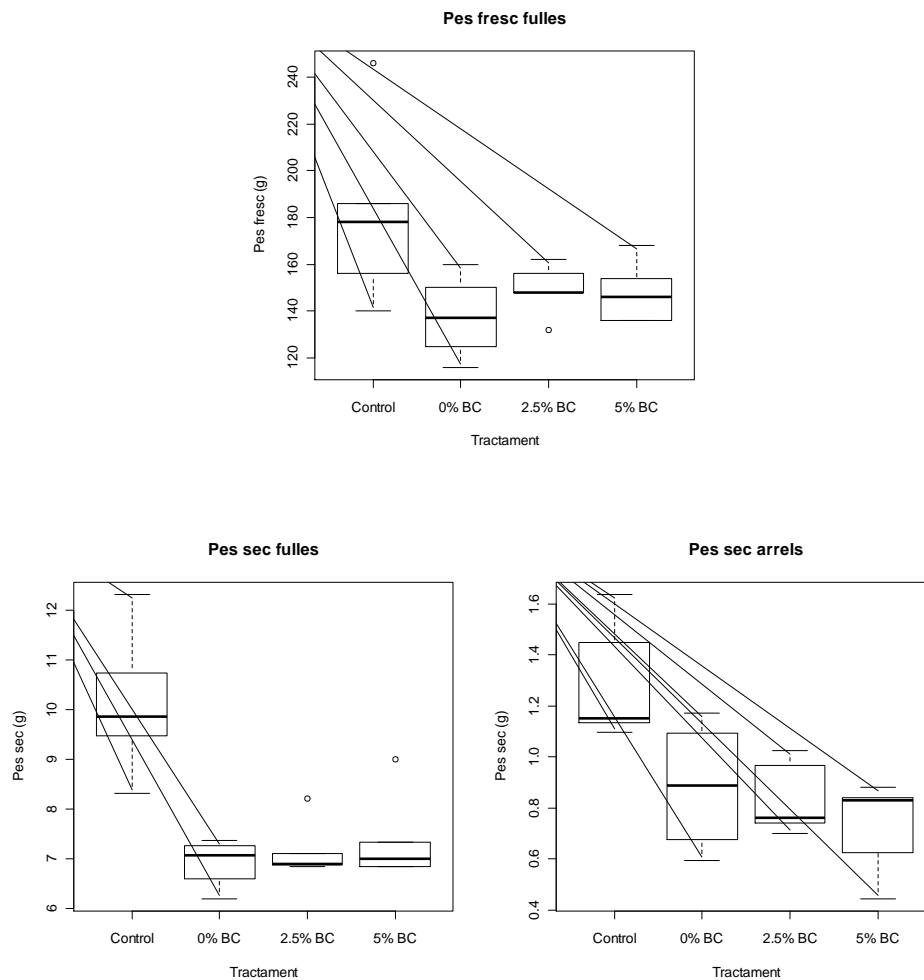


Figura 22. Diagrames de caixa del pes fresc de les fulles, pes sec de les fulles i pes sec de les arrels en funció del tractament amb un nivell de significança del 5% (BC: biochar)

4.2. Resultats en la determinació de composició de clorofil·les

4.2.1. Patrons de calibratge SPAD-clorofil·les

Per a estimar la composició de clorofil·les, utilitzant la tecnologia de l'SPAD, de les diferents mostres procedents dels 4 tractaments del nostre assaig es van realitzar unes gràfiques de calibratge (Figura

23, 24, 25) que relacionen la concentració de clorofil·les obtinguda en les mostres patró, a partir de l'extracció de les mateixes per tècniques espectrofotomètriques, amb la lectura de l'SPAD.

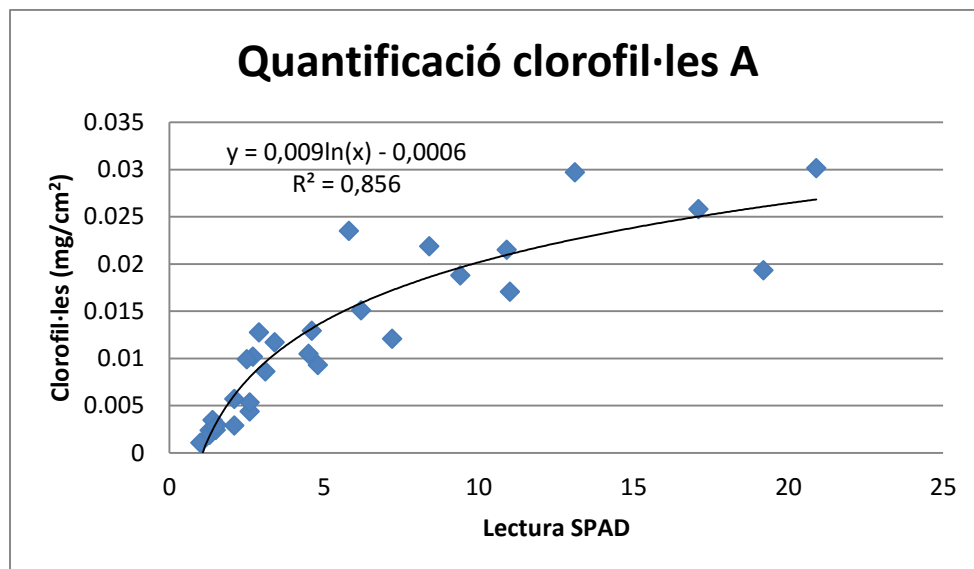


Figura 23. Gràfica de quantificació de clorofil·les A

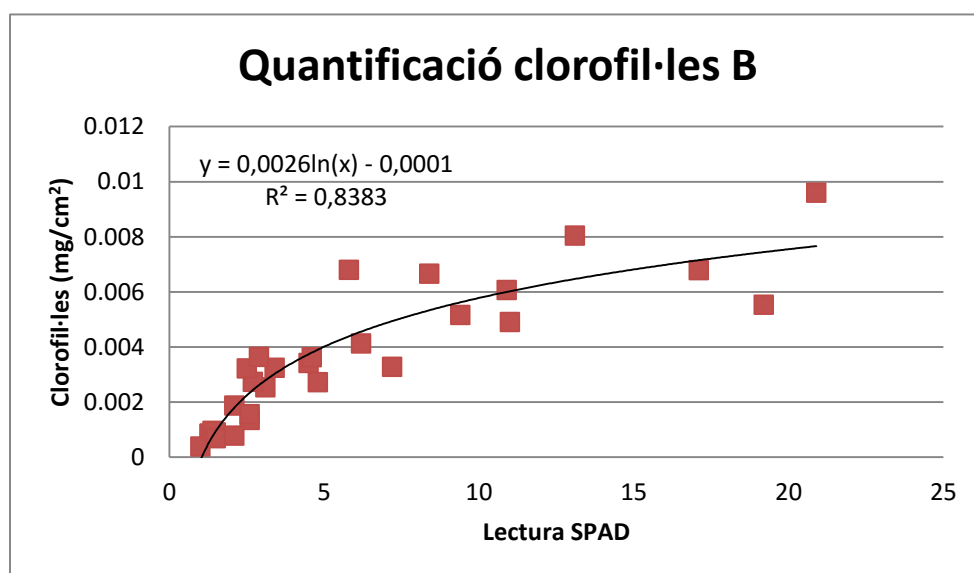


Figura 24. Gràfica de quantificació de clorofil·les B

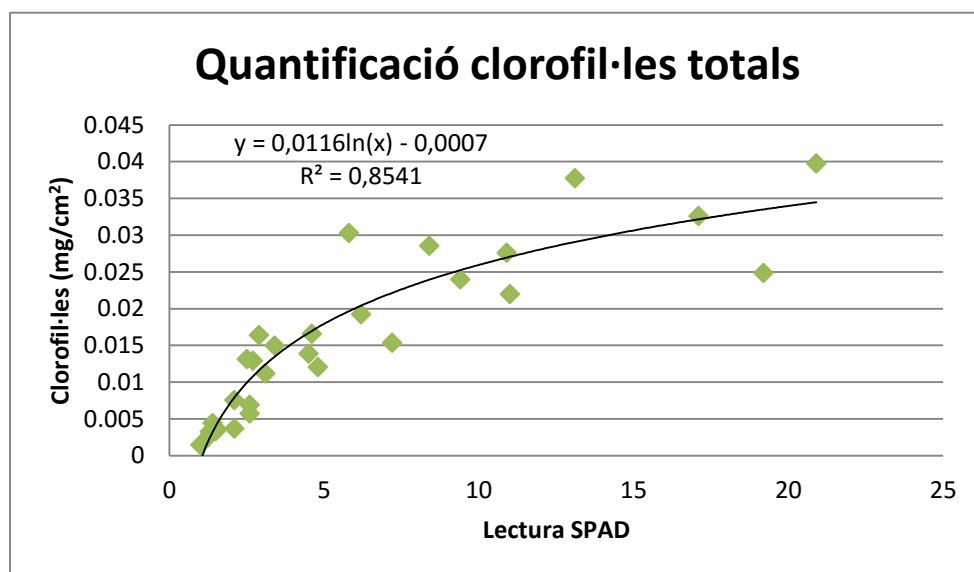


Figura 25. Gràfica de quantificació de clorofil·les totals

Les línies de tendència obtingudes a partir de les gràfiques realitzades (Figura 26) presentaven un elevat coeficient de determinació (R^2), en tots els casos superior a 0,838. Com a conseqüència d'aquests elevats coeficients de determinació va ser possible avaluar a posteriori els continguts de clorofil·la de les mostres de les fulles fresques de l'assaig a partir dels resultats obtinguts prèviament amb l'SPAD. Per als tres tipus de clorofil·les aquestes línies de tendència i el valor R quadrat són:

$$\text{Clorofil · les A} \rightarrow y = 0,009 \times \ln(x) - 0,0006$$

$$R^2 = 0,856$$

$$\text{Clorofil · les B} \rightarrow y = 0,0026 \times \ln(x) - 0,0001$$

$$R^2 = 0,8383$$

$$\text{Clorofil · les totals} \rightarrow y = 0,0116 \times \ln(x) - 0,0007$$

$$R^2 = 0,8541$$

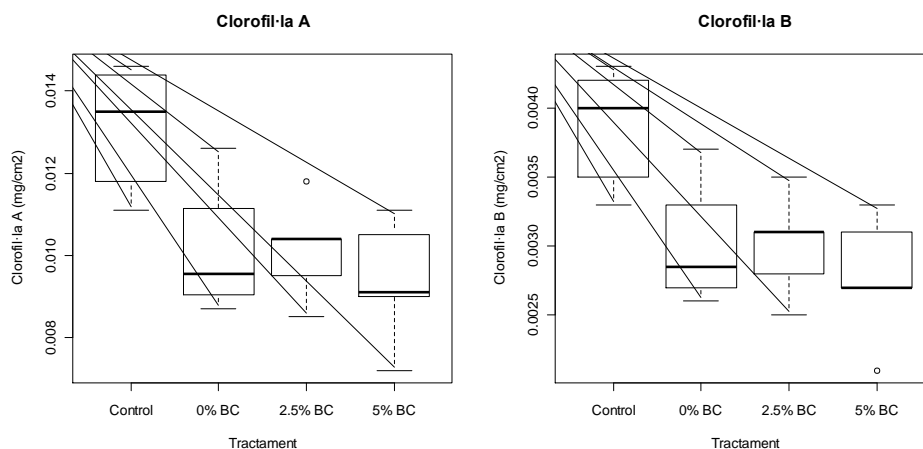
Figura 26. Línies de tendència obtingudes a partir de les rectes de calibratge

4.2.2. Determinació del contingut de clorofil·les

En la taula 10 i la figura 27 es mostren els promitjos i les desviacions estàndards dels resultats obtinguts de les clorofil·les a, b i totals de les mostres utilitzades en l'experiment per a cadascun dels 4 tractaments. L'anàlisi estadística d'aquests resultats indica que l'addició de contaminants orgànics emergents utilitzats en aquest assaig en l'aigua de reg afecta, negativament, disminuint la quantitat de clorofil·les, tant a i b com totals en les fulles. La incorporació de biochar, tant en una dosi del 2,5% com del 5%, en sòl no ha significat un augment en l'activitat fotosintètica realitzada per les plantes, és a dir, no ha contrarestat l'efecte advers dels contaminants emergents addicionats.

Taula 10. Resultats de la composició de clorofil·les A, B i totals amb un nivell de significança del 5% (0: Control; 1: Contaminant/no biochar; 2: Contaminant/2.5% biochar; 3: Contaminant/5% biochar) (Els promitjos que continguin la mateixa lletra no són significativament diferents)

Tractament	Clorofil·la A (mg/cm ²)	Clorofil·la B (mg/cm ²)	Clorofil·les Totals (mg/cm ²)
0	0,01308 ± 0,00154 a	0,00386 ± 0,00045 a	0,01690 ± 0,00199 a
1	0,01010 ± 0,00170 b	0,00300 ± 0,00049 b	0,01310 ± 0,00219 b
2	0,01012 ± 0,00123 b	0,00300 ± 0,00036 b	0,01308 ± 0,00159 b
3	0,00938 ± 0,00152 b	0,00278 ± 0,00044 b	0,01216 ± 0,00196 b



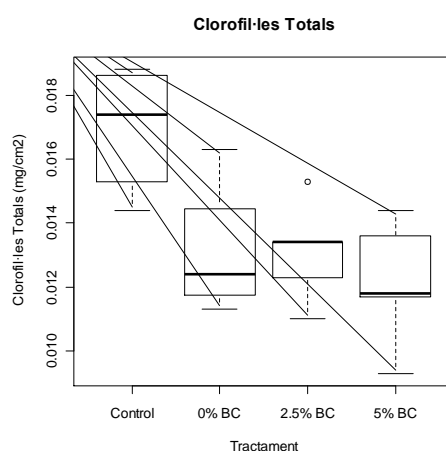


Figura 27. Diagrames de caixa de la composició de clorofil·les A, B i totals en funció del tractament amb un nivell de significança del 5% (BC: biochar)

4.2.2.1. Determinació del contingut de clorofil·les segons la posició de la fulla

En les taules 11, 12 i 13 es mostren els promitjos i les desviacions estàndards dels resultats obtinguts en la determinació de les clorofil·les a, b i totals, respectivament. Els resultats obtinguts són de les mostres utilitzades en l'experiment, per a cada tipus de tractament i segons la posició de la fulla, exterior, intermitja i interior. L'anàlisi estadística d'aquests resultats mostra que en les fulles de la part exterior, l'addició de contaminants orgànics emergents en l'aigua de reg afecta negativament en la producció de clorofil·les. Tot i això, en el tractament amb més incorporació de biochar (5%) es pot observar una tendència més similar al control. En les fulles de la part intermitja de la planta no hi ha una tendència clara, i sorprèn que en el tractament amb més quantitat de biochar hi hagi una disminució en la quantitat de clorofil·les. Aquest fet es pot deure a un problema de mostreig, ja que aquesta part de la planta és la que presenta més dificultats a l'hora de mostrejar a causa de tenir més diversitat de tonalitats i està menys delimitada. En les fulles de la part interior de la planta no s'observen diferències significatives entre tractaments, possiblement degut a la baixa activitat fotosintètica en aquesta part de la planta.

Taula 11. Resultats de la composició de clorofil·les A segons la posició de la fulla i el tractament, amb un nivell de significança del 5% (0: Control; 1: Contaminant/no biochar; 2: Contaminant/2.5% biochar; 3: Contaminant/5% biochar) (Els promitjos que continguin la mateixa lletra no són significativament diferents)

Clorofil·la A (mg/cm ²)			
Tractament	Exterior	Intermitja	Interior
0	0,01762 ± 0,00312 a	0,01490 ± 0,00245 a	0,00664 ± 0,00196 a
1	0,01193 ± 0,00289 b	0,01148 ± 0,00303 ab	0,00690 ± 0,00123 a
2	0,01282 ± 0,00150 b	0,01154 ± 0,00297 ab	0,00592 ± 0,00090 a
3	0,01420 ± 0,00226 ab	0,00842 ± 0,00242 b	0,00554 ± 0,00066 a

Taula 12. Resultats de la composició de clorofil·les B segons la posició de la fulla i el tractament, amb un nivell de significança del 5% (0: Control; 1: Contaminant/no biochar; 2: Contaminant/2.5% biochar; 3: Contaminant/5% biochar) (Els promitjos que continguin la mateixa lletra no són significativament diferents)

Clorofil·la B (mg/cm ²)			
Tractament	Exterior	Intermitja	Interior
0	0,00516 ± 0,00090 a	0,00436 ± 0,00071 a	0,00198 ± 0,00057 a
1	0,00350 ± 0,00084 b	0,00340 ± 0,00088 ab	0,00208 ± 0,00035 a
2	0,00378 ± 0,00043 b	0,00342 ± 0,00086 ab	0,00180 ± 0,00026 a
3	0,00418 ± 0,00065 ab	0,00250 ± 0,00070 b	0,00166 ± 0,00019 a

Taula 13. Resultats de la composició de clorofil·les totals segons la posició de la fulla i el tractament, amb un nivell de significança del 5% (0: Control; 1: Contaminant/no biochar; 2: Contaminant/2.5% biochar; 3: Contaminant/5% biochar) (Els promitjos que continguin la mateixa lletra no són significativament diferents)

Clorofil·les Totals (mg/cm ²)			
Tractament	Exterior	Intermitja	Interior
0	0,02278 ± 0,00402 a	0,01932 ± 0,00316 a	0,00862 ± 0,00252 a
1	0,01543 ± 0,00373 b	0,01488 ± 0,00391 ab	0,00900 ± 0,00158 a
2	0,01662 ± 0,00193 b	0,01492 ± 0,00382 ab	0,00770 ± 0,00116 a
3	0,01838 ± 0,00291 ab	0,01094 ± 0,00311 b	0,00718 ± 0,00085 a

4.3. Resultats en la determinació de l'estrès oxidatiu

4.3.1. Patró de l'estrès oxidatiu

Per determinar l'estrès oxidatiu que els COEs podien generar en el material vegetal va caldre prèviament definir una recta de regressió patró amb els nivells de fortificació d'H₂O₂ que es mostren en la taula 14. A partir d'aquests nivells de fortificació es van obtenir unes absorbàncies a partir de lectures espectrofotomètriques. La recta de regressió obtinguda va donar un coeficient de determinació (R²) elevat, de 0,99 (Figura 28).

Taula 14. Determinació de la recta de regressió patró

Mostra	[H ₂ O ₂] (ppm)	Abs (390 nm)
P1	50	2,4574
P2	35	1,9484
P3	20	1,2064
P4	10	0,6176
P5	5	0,3134
P6	1	0,0866
P7	0,5	0,0918
P8	0,1	0,0640

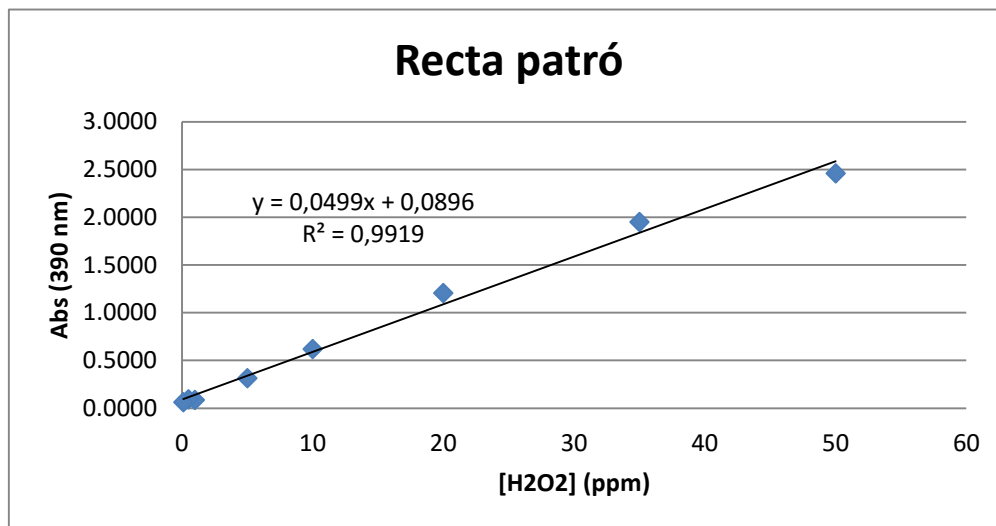


Figura 28. Recta de regressió patró per a la determinació de l'estrès oxidatiu

4.3.2. Determinació de l'estrès oxidatiu en planta

El procediment per a determinar l'estrès oxidatiu de les mostres de material vegetal es va repetir nombroses vegades modificant molts aspectes del mètode, com per exemple, ampliar la recta de calibratge, fer recta de calibratge amb matriu (extracte com a dissolvent), comparar recta amb TCA i amb H₂O com a dissolvent, triturar l'enciam amb nitrogen líquid i picadora, centrifugar amb una ultracentrífuga refrigerada i refrigerar abans de centrifugar. Tot i aquestes modificacions, les mostres que havien estat regades amb COEs no presentaven estrès oxidatiu.

4.4. Avaluació del mètode per a determinar l'estrès oxidatiu

Per a realitzar l'avaluació del mètode es van fortificar 5 mostres d'enciam amb 300 ppm de H₂O₂ i 5 mostres amb 50 ppm (Taula 15). Amb aquests nivells de fortificació es pretenia saber l'exactitud del mètode, el nivell de detecció i el nivell de quantificació.

Taula 15. Valors d'absorbància i contingut d'H₂O₂ fortificant a 300ppm i 50ppm

Mostra	Pes (mg)	[H ₂ O ₂] fort. (ppm)	Abs (390 nm)	[H ₂ O ₂] obtingut (ppm)
1	505	300	1,2549	23,35271
2	503	300	1,2662	23,57916
3	502	300	1,2855	23,96593
4	503	300	1,2818	23,89178
5	501	300	1,2335	22,92385
6	499	50	0,1196	0,60120
7	500	50	0,1198	0,60521
8	499	50	0,1171	0,55110
9	497	50	0,1169	0,54709
10	506	50	0,1113	0,43487

Taula 16. Valors de mitjana, desviació estàndard i exactitud de les mostres fortificades

	Mostres fortificades amb 300 ppm	Mostres fortificades amb 50 ppm
Mitjana	23,54269	0,547896
Desviació estàndard	0,424673	0,068761
Exactitud	78,47562	10,95792



Tal com s'observa a la taula 16, el mètode perd exactitud a concentracions baixes.

Per a determinar el LOD (límit de detecció) i el LOQ (límit de quantificació) es necessiten una sèrie de paràmetres que es detallen a la taula 17.

Taula 17. Paràmetres per a determinar el límit de quantificació i el límit de detecció del mètode

	Pendent	Ordenada origen
Paràmetre	0,049910851	0,0896
Desv. estàndard	0,001837077	0,0423
R²	0,991936939	0,0901

La mínima quantitat de peròxid d'hidrogen que es va poder detectar amb certesa raonable (LOD) és de 2,55 ppm i la mínima quantitat que va poder ser mesurada amb precisió i exactitud (LOQ) és de 8,48 ppm.

DISCUSSIÓ

5. Discussió

5.1. Efecte de l'addició de COEs en la biomassa i les clorofil·les

L'anàlisi dels resultats dels pesos secs i dels continguts en clorofil·les de la biomassa obtinguda indica clarament que els COEs incorporats afecten, negativament, el desenvolupament del material vegetal i que l'addició de BC tampoc contribueix a contrarestar els efectes. L'avaluació de les clorofil·les és un bon indicador per a determinar el grau de toxicitat, ja que l'eficiència de l'activitat fotosintètica és afectada per qualsevol estrès ambiental (40). En el nostre assaig el contingut de les clorofil·les obtingut en els tractaments addicionats amb COEs és baix en relació amb el control, indicant-nos que realment aquests han causat fitotoxicitat. Tot i que aquest estudi no tenia com a objectiu determinar concentracions a nivell de planta, els resultats obtinguts ens indiquen que possiblement hi ha hagut una acumulació a nivell de fulles i arrels, ja que tal com indica el grup de Jones-Leep diferents contaminants emergents es detecten en planta encara que les dosis utilitzades siguin molt baixes (41).

L'estimació de clorofil·les es va realitzar mitjançant lectures d'SPAD que posteriorment es van relacionar amb continguts reals de clorofil·les obtinguts a partir d'una extracció. Són varis els autors que en els seus estudis han treballat amb SPAD (42–44) i que han mesurat l'absorvència dels extractes a unes longituds d'ona semblants a les del nostre assaig (647 i 664,5 nm) (36,45–48).

Cal assenyalar que entre el tractament 2 (addició de contaminants amb addició de 2,5% de biochar en el sòl) i el control no hi ha diferències significatives pel que fa a la variable del pes fresc de les fulles. El fet de que els valors absoluts d'aquesta variable en els tractaments addicionats amb contaminants són molt similars entre ells i estadísticament iguals, ens pot indicar que s'hagi comès algun petit error en la pesada del pes fresc del tractament 2. La quantificació de la variable pes fresc intrínsecament sempre porta un error addicionat.

El fet d'utilitzar dosis elevades en el nostre assaig, molt superiors a les que es troben en situacions reals (aigua de reg, biosòlids), possiblement no ha permès que part d'aquests COEs hagin estat degradats a nivell del sòl i que gran part d'ells no hagin pogut estar adsorbits pel biochar. Així doncs, aquestes altes dosis han afectat negativament al cultiu d'enciam, encara que possiblement alguns

dels COEs utilitzats hagin estat metabolitzats a nivell de planta (6). Com es veurà a continuació, són bastants els treballs que igual que en el nostre estudi, contrasten dosis més elevades de COEs que les que es donen en el medi ambient. Això es dur a terme per tal de “simular” possibles acumulacions en el medi i per facilitar la seva detecció a nivell analític.

Els nostres resultats concorden amb els obtinguts per altres autors. La bibliografia existent remarca clarament que el contingut de clorofil·les i en conseqüència la biomassa es veuen afectats quan el material vegetal està exposat a diferents xenobiòtics, principalment a dosis elevades. Per exemple, diferents autors remarquen que dosis elevades de BPA o productes derivats afecten la germinació i/o el desenvolupament de diferents hortalisses i blat dur (49), soja (50,51), blat (52) i *Arabidopsis* (53). D'altres indiquen que l'aplicació d'altres dosis d'hormones excretades per humans i animals disminueixen la producció de biomassa en lleguminoses (54,55). En el cas dels fàrmacs, la utilització d'altres dosis de carbamazepina afecten el creixement de boga (56). La presència d'un derivat del BAP redueix el contingut de clorofil·les en el cultiu de blat (57) i en soja (50).

Visualment, els enciams obtinguts en aquest assaig no presentaven diferències apreciables entre ells i les unitats obtingudes haguessin estat aptes per a la venda. Això ens fa pensar que en el cas de l'enciam, tot i la fitotoxicitat determinada estadísticament al avaluar els pesos i les clorofil·les, al ser un cultiu de ràpid creixement presenta una certa tolerància als COEs. Moltes espècies presenten resistència a diferents COEs, tot i que alguns autors indiquen que la tolerància depèn no només de la espècie (58–61), sinó també dels clons (60), dels contaminants (59,62) i de la biodisponibilitat en el sòl (62). Els estudis de Sabourin (63) indiquen que els continguts presents de COEs detectats en cultius produïts a l'aire lliure són molt inferiors que els obtinguts en condicions d'hivernacle (6,41,64–67). Segons indica el grup de Boxall el lloc de la planta on s'acumulen els contaminants depèn de l'espècie (68).

Diferents grups han trobat presència de diferents fàrmacs en cultius comestibles i farratges regats amb aigües o adobats amb fems amb continguts reals d'analits (6,63,66,67,69–72). En relació als fàrmacs, el grup de Malchi afirma que les concentracions que es troben en les plantes depenen de si els productes farmacèutics són de tipus iònic (ibuprofè i àcid clofíbric) o bé no iònic (carbamazepina) (73) i el grup de Wu indiquen que els productes bàsics i neutres es detecten en més altes concentracions que els àcids (74). S'ha detectat més contingut d'ibuprofè que de carbamazepina en blat de moro i gira-sol, essent la presència en aquest darrer cultiu inferior (75).



Algunes espècies com l'arròs presenten sensibilitat a alguns antibiòtics, com per exemple, la sulfametoxazole (59).

Agents desinfectants com el triclosan estan presents en molts biosòlids i en freqüència són bioacumulats i poden induir fitotoxicitat. Freqüentment han estat detectats en plantes (6,76). S'ha vist que inhibeix el creixement en diferents espècies crescudes en aiguamolls (77), mongetes (55), arròs i cogombre (59) i enciam (51). El TCS és un producte altament concentrat a nivell radicular, i això podria provocar la seva translocació (62,78). No obstant, els estudis de Macherius (79) indiquen que, tot i que van detectar acumulació de TCS en arrels d'ordi, festuca i pastanaga, en cap cas van detectar la seva presència en fulles.

Tal com hem dit, en aquest estudi només s'ha utilitzat una concentració elevada de COEs i no s'ha estudiat si el fet d'utilitzar dosis baixes de COEs podria significar un efecte estimulants en el desenvolupament del cultiu. Són varis els autors que han trobat aquest efecte (49–51,53,80–83).

5.2. Efecte de l'addició de biochar en l'assaig

L'addició de dues dosis diferents de biochar en l'assaig realitzat no ha representat cap efecte aparentment positiu en l'activitat fotosintètica i en la producció de biomassa. Les variables avaluades en aquest treball no permeten estimar si realment ha tingut algun efecte positiu, ja que no s'han quantificat els contaminants presents en sòl, fulla i arrel en els diferents tractaments. No obstant, el fet de que la incorporació de biochar no hagi manifestat un efecte "aparentment" positiu en l'adsorció de contaminants orgànics emergents pot ser atribuïble a que les dosis de COEs utilitzades han estat relativament elevades, superiors a les detectades en aigües residuals o de rius. Les concentracions detectades per l'equip de Calderón-Preciado en aigües de depuradora (0,056-12,5 µg/L) i en aigües superficials (0,01-1,04 µg/L) (1,84) són inferiors que les utilitzades en el nostre assaig (15 µg/L). La bibliografia també confirma que com menor sigui la concentració del COE, s'aconsegueix un millor efecte d'adsorció del biochars (85).

L'eficiència d'adsorció del biochar sembla estar influenciada per les propietats del propi biochar, el seu tractament d'obtenció, pH, dosis dels contaminants, competència entre anions i temperatura

(86,87). En diferents tipus de biochar s'han vist efectes positius en la retenció d'alguns COEs, com per exemple amb la retenció d'Ibuprofè amb biochar procedent de fusta de pi (88), de Sulfametazina amb biochar obtingut a partir de residus de cultiu de te (89). Sembla ser que les temperatures elevades (700°C) produeix una retenció més elevada de contaminants (90). L'equip del Denyes, provant diferents tipus de biochars, van aconseguir disminuir la concentració de contaminants orgànics en el cultiu de carbassera (91).

L'efecte de l'augment de la retenció d'aigua en el sòl quan s'aplica biochar, que pot conduir a un augment de la productivitat (87) dels cultius, tampoc es pot confirmar en aquest assaig, ja que el cultiu d'enciam es va fer en condicions de regadiu.

5.3. Anàlisi de l'estrès oxidatiu i avaluació del mètode

Les respostes a diferents estressos ambientals és l'acumulació de ROS i els canvis en l'estat redox cel·lular (92–94). El peròxid d'hidrogen és una important molècula indicadora en el desenvolupament de les plantes en relació a l'estrès ambiental.

Les plantes contenen diferents tipus d'enzims que permeten metabolitzar peròxids, tal com el peròxid d'hidrogen. Dintre d'aquests enzims es poden citar les catalases (95), que formen part del sistema antioxidant de les plantes (96).

L'assaig analític utilitzat en aquest treball per a determinar l'estrès oxidatiu no va permetre detectar la formació de peròxid d'hidrogen. Això, que en un principi podríem interpretar com que el cultiu no ha patit estrès, no és cert ja que hem vist que el cultiu sí que ha patit algun tipus d'estrès, tal com es reflexa en l'activitat fotosintètica i en la biomassa produïda en els tractaments que contenen els analits. La temperatura de -20°C a la que es van emmagatzemar les mostres de material vegetal durant 5 mesos probablement no ha estat suficient per anular l'activitat de l'enzim catalasa, deduint que possiblement la catalasa ha descompost el peròxid en oxigen i aigua.

A causa de no poder determinar l'estrès oxidatiu, el que es va fer va ser una avaluació del mètode, a partir d'utilitzar material vegetal no tractat amb COEs fortificat amb H₂O₂, per a propers treballs analítics. El resultat d'aquesta avaluació ens indica que el mètode perd exactitud a concentracions



baixes de peròxid d'hidrogen. Una possible raó podria ser atribuïble a que l'enzim catalasa no ha estat del tot inactivat pel reactiu TCA, i per tant aquest enzim segueix consumint H_2O_2 . En conseqüència, a dosis baixes d'aquest oxidant, la seva reacció amb la catalasa és molt més significativa.

CONCLUSIONS



6. Conclusions

Les principals conclusions d'aquest treball són:

- Els contaminants emergent addicionats, en la concentració assajada de 15 ng/mL, a l'aigua de reg, han afectat la quantitat de biomassa produïda tant a nivell de fulles, amb una pèrdua de 3,2 g en pes sec, com de formació d'arrels (pèrdua de 0,4 g).
- Els coeficients de determinació (clorofil·la a: 0,856, clorofil·la b: 0,838 i clorofil·les totals: 0,854) obtinguts al relacionar les lectures d'SPAD i la concentració de clorofil·les han estat elevats (mostres patró), permetent la posterior utilització de l'SPAD com a metodologia de quantificació de les clorofil·les (mostres assaig).
- L'addició de contaminants orgànics emergents en l'aigua de reg ha disminuït la quantitat de clorofil·les a, b i totals en $2,98 \cdot 10^{-3}$ mg/cm², $8,6 \cdot 10^{-4}$ mg/cm² i $3,8 \cdot 10^{-3}$ mg/cm², respectivament.
- La incorporació de biochar en el sòl (2,5% i 5%) no ha contribuït a contrarestar l'efecte de la presència de contaminants emergents pel que fa a la producció de biomassa i concentració de clorofil·les.
- L'emmagatzematge del material vegetal a -20°C durant 5 mesos no ha resultat idoni per a frenar l'activitat de la catalasa, i per tant, no s'ha detectat estrès oxidatiu.
- La recta de regressió obtinguda per a quantificar l'estrès oxidatiu va donar un coeficient de determinació molt elevat (0,99).
- L'avaluació del mètode per a determinar l'estrès oxidatiu ens indica que quan la concentració de peròxid d'hidrogen es baixa el mètode perd exactitud. La mínima quantitat que es pot detectar amb certesa raonable és de 2,5 ppm i la mínima quantitat que pot ser mesurada amb precisió i exactitud és de 8,48 ppm.

7. Bibliografia

1. Calderón-Preciado D, Jiménez-Cartagena C, Matamoros V, Bayona JM. Screening of 47 organic microcontaminants in agricultural irrigation waters and their soil loading. *Water Res.* 2011;45:221–31.
2. Calderón-Preciado D, Renault Q, Matamoros V, Cañameras N, Bayona JM. Uptake of organic emergent contaminants in spath and lettuce: An in vitro experiment. *J Agric Food Chem.* 2012;60:2000–7.
3. Winpenny J (Wychwood ECL, Heinz I, Koo-Oshima S. Reutilización del agua en la agricultura: ¿Beneficios para todos? [Internet]. Organizaci. Roma; 2013. Available from: <http://www.fao.org/docrep/017/i1629s/i1629s.pdf>
4. Iglesias Esteban R, Ortega de Miguel E. Present and future of wastewater reuse in Spain. *Desalination.* 2008;218(February 2006):105–19.
5. Chen W, Xu J, Lu S, Jiao W, Wu L, Chang AC. Fates and transport of PPCPs in soil receiving reclaimed water irrigation. *Chemosphere* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;93(10):2621–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.088>
6. Wu C, Spongberg AL, Witter JD, Fang M, Czajkowski KP. Uptake of pharmaceutical and personal care products by soybean plants from soils applied with biosolids and irrigated with contaminated water. *Environ Sci Technol.* 2010;44(16):6157–61.
7. Parr J, Smith M, Shaw R. Wastewater treatment options. *Water Environ Heal London Loughbrgh* [Internet]. :125–8. Available from: <http://www.lboro.ac.uk/well/resources/technical-briefs/64-wastewater-treatment-options.pdf>
8. Boletín Oficial del Estado. Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. *Boe* [Internet]. 2007;46932–46. Available from: http://www.boe.es/aeboe/consultas/bases_datos/doc.php?id=BOE-A-2008-18947
9. Magrama. Directiva 91/271/CEE sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas. 2003;133. Available from: http://www.magrama.gob.es/ca/agua/publicaciones/03_Manual_Directiva_91_271_CE_E_tcm8-28959.pdf
10. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de octubre de 2000 por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. 2000;(7):1–73.
11. Jiménez Cartagena C. Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: Productos farmaceuticos. *Rev Lasallista Investig.* 2011;8:143–53.



12. Matamoros V, Calderón-Preciado D, Domínguez C, Bayona JM. Analytical procedures for the determination of emerging organic contaminants in plant material: A review. *Anal Chim Acta* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;722:8–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.02.004>
13. Kiderman Fuentealba GA, Medina Aros ME, Mihovilovich Roa KE. “Productos Farmacéuticos y de Cuidado Personal PPCPs.” *Ing y Medio Ambient.* :1–6.
14. Damià Barceló L, López de Alda MJ. Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Panel científico técnico Seguim la política del agua Jorn Present Result [Internet]. 2008;1–27. Available from: <http://www.unizar.es/fnca/index3.php?id=1&pag=24>
15. Almarcha D, Almarcha M, Riera P, Rabella R. Contaminants emergents [Internet]. Diputació de Barcelona; 2011. Available from: www.diba.cat/llicencia
16. The PubChem Project [Internet]. [cited 2015 Aug 31]. Available from: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
17. Lehmann J, Joseph S. Biochar for Environmental Management : An Introduction. Science And Technology. 2009.
18. Nartey OD, Zhao B. Biochar Preparation, Characterization, and Adsorptive Capacity and Its Effect on Bioavailability of Contaminants: An Overview. *Hindawi Publ Corp.* 2014;2014:12.
19. Ogbonnaya U, Semple K. Impact of Biochar on Organic Contaminants in Soil: A Tool for Mitigating Risk? *Agronomy* [Internet]. 2013;3:349–75. Available from: <http://www.mdpi.com/2073-4395/3/2/349/>
20. Pérez-herrero E. Efecte sobre la capacitat d'intercanvi catiònic del sòl i la retenció de nutrients de les aplicacions de biochar en sòls agrícoles. Proyecto Final de Carrera. Universitat Autònoma de Barcelona; 2013.
21. International Biochar Initiative [Internet]. [cited 2015 Aug 24]. Available from: <http://biochar-international.org/>
22. Teixidó M. Agents antimicrobians en el sistema sòl-aigua : estudis de sorció. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona; 2013.
23. Biel M. Estimación de la movilidad del ibuprofeno en suelos agrícolas. Proy 2012 Master Univ en Hidrol y gestión Recur hídricos [Internet]. 2012;47–75. Available from: http://www.google.es/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CFAQFjAA&url=http://www2.uah.es/master_universitario_hidrologia/archivos/proyectos_2012.p

df&ei=ct6bUvboMqbG0QWAqYAY&usg=AFQjCNHVnMVImM8rDEk164ESuJvKI6Fd7g&sig2=rIIA3zebulZtUMA8BVhi4Q&bvm=b

24. Calderón Preciado D. Dinámica de microcontaminantes orgánicos en aguas de riego agrícola y su incorporación potencial en especies vegetales de interés agronómico. Universitat Politècnica de Catalunya; 2012.
25. Veskoukis AS, Tsatsakis AM, Kouretas D. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress Chaperones*. 2012;17:11–21.
26. Halliwell B. Antioxidant characterization methodology and mechanism. 1995;49(10):2952.
27. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*. 2000;163:219.
28. Lozano C. Nous derivats de flavanols a partir de subproductes vegetals . Síntesi , purificació i avaluació de la seva capacitat antiradicalària i pro-apoptòtica en cèl · lules no tumorals i canceroses. Tesi doctoral. Universitat de Barcelona; 2005.
29. Badui S, Guerrero I, López E, Armenta R. Química de los alimentos [Internet]. Ed. Pearson educación. 2006. Available from: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=LIBROSNL.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expression=mfn=004719>
30. De la Paz Jara C. Estabilidad de pigmentos antioxidantes del jugo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) como potencial complemento de alimentos funcionales [Internet]. In Vitro. Universidad Austral de Chile; 2008. p. 1–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.myaccess.library.utoronto.ca/pubmed/11720961>
31. Fatta-Kassinos D, Meric S, Nikolaou A. Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: Current state of knowledge and future research. *Anal Bioanal Chem*. 2011;399:251–75.
32. Halling-Sorensen B, Nielsen SN, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lutzhoft HC, Jorgensen SE. Occurrence, fate and effects of pharmaceuticals substance in the environment - A review. *Chemosphere*. 1998;36(2):357–93.
33. Grassi M, Rizzo L, Farina A. Endocrine disruptors compounds, pharmaceuticals and personal care products in urban wastewater: Implications for agricultural reuse and their removal by adsorption process. *Environ Sci Pollut Res*. 2013;20:3616–28.
34. Hoagland D., Arnon D. The water culture methods for growing plants without soil. *Circ Calif Agric Exp Stn*. 1950;347.



35. Vegetation measurements [Internet]. [cited 2015 Sep 3]. Available from: <http://www.uv.es/~leo/sen2flex/vegetation.htm>
36. Porra RJ. The checkered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynth*. 2002;149–56.
37. Inskeep WP, Bloom PR. Extinction coefficients of chlorophyll a and b in n,n-dimethylformamide and 80% acetone. *Plant Physiol*. 1985;77(14):483–5.
38. Velikova V, Yordanov I, Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci*. 2000;151:59–66.
39. Jurado JM. Aplicación de Microsoft Excel a la Química Analítica : validación de métodos analíticos. 2008;(1).
40. González-Naranjo V, Boltes K, de Bustamante I, Palacios-Díaz P. Environmental risk of combined emerging pollutants in terrestrial environments: chlorophyll a fluorescence analysis. *Environ Sci Pollut Res* [Internet]. 2014;6920–31. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-014-3899-z>
41. Jones-Lepp T, Sanchez C, Moy T, Kazemi R. Method development and application to determine potential plant uptake of antibiotics and other drugs in irrigated crop production systems. *Agric Food Chem*. 2010;58(22):11568–73.
42. Silla F, González-Gil A, González-Molina ME, Mediavilla S, Escudero A. Estimation of chlorophyll in *Quercus* leaves using a portable chlorophyll meter: effects of species and leaf age. *Ann For Sci*. 2010;67:108.
43. Parry C, Blonquist JM, Bugbee B. In situ measurement of leaf chlorophyll concentration: analysis of the optical/absolute relationship. *Plant Cell Environ* [Internet]. 2014;2508–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24635697>
44. Nauš J, Prokopová J, Řebíček J, Špundová M. SPAD chlorophyll meter reading can be pronouncedly affected by chloroplast movement. *Photosynth Res*. 2010;105:265–71.
45. Yoder BJ, Pettigrew-Crosby RE. Predicting nitrogen and chlorophyll content and concentrations from reflectance spectra (400-2500 nm) at leaf and canopy scales. *Remote Sens Environ*. 1995;53(1995):199–211.
46. Ramos dos Reis LC, Ruffo de Oliveira V, Kienzle Hagen ME, Jablonski A, Hickmann Flôres S, de Oliveira Rios A. Carotenoids, flavonoids, chlorophylls, phenolic compounds and antioxidant activity in fresh and cooked broccoli (*Brassica oleracea* var. Avenger) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. Alphina F1). *LWT - Food Sci Technol* [Internet].

- 2015;63:177–83. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002364381500242X>
47. Malenovský Z, Homolová L, Zurita-Milla R, Lukeš P, Kaplan V, Hanuš J, et al. Retrieval of spruce leaf chlorophyll content from airborne image data using continuum removal and radiative transfer. *Remote Sens Environ*. 2013;131:85–102.
 48. Ritchie RJ. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynth Res*. 2006;89:27–41.
 49. Ferrara G, Loffredo E, Senesi N. Phytotoxic, clastogenic and bioaccumulation effects of the environmental endocrine disruptor bisphenol A in various crops grown hydroponically. 2006;223(5).
 50. Qiu Z, Wang L, Zhou Q. Effects of bisphenol A on growth, photosynthesis and chlorophyll fluorescence in above-ground organs of soybean seedlings. *Chemosphere* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;90(3):1274–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.085>
 51. Wang S, Wang L, Hua W, Zhou M, Wang Q, Zhou Q, et al. Effects of bisphenol A, an environmental endocrine disruptor, on the endogenous hormones of plants. *Environ Sci Pollut Res* [Internet]. 2015; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-015-4972-y>
 52. Dogan M, Korkunc M, Yumrutas O. Effects of Bisphenol A and Tetrabromobisphenol A on Bread and Durum Wheat Varieties. *Ekoloji* [Internet]. 2012;21:114–22. Available from: <http://www.ekoloji.com.tr/resimler/85-13.pdf>
 53. Pan WJ, Xiong C, Wu QP, Liu JX, Liao HM, Chen W, et al. Effect of BPA on the germination, root development, seedling growth and leaf differentiation under different light conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;93(10):2585–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.081>
 54. Shore LS, Kapulnik Y, Gurevich M, Wininger S. Induction of phytoestrogen production in *Medicago sativa* leaves by irrigation with sewage water. *Environ Exp Bot*. 1995;35(September 2015):363–9.
 55. Karnjanapiboonwong A, Chase D a., Cañas JE, Jackson W a., Maul JD, Morse AN, et al. Uptake of 17 α -ethynylestradiol and triclosan in pinto bean, *Phaseolus vulgaris*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2011;74:1336–42.
 56. Dordio a. V., Belo M, Martins Teixeira D, Palace Carvalho a. J, Dias CMB, Picó Y, et al. Evaluation of carbamazepine uptake and metabolization by *Typha* spp., a plant with potential use in phytotreatment. *Bioresour Technol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;102(17):7827–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.050>



57. Li Y, Zhou Q, Li F, Liu X, Luo Y. Effects of tetrabromobisphenol A as an emerging pollutant on wheat (*Triticum aestivum*) at biochemical levels. *Chemosphere* [Internet]. Elsevier Ltd; 2008;74(1):119–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.08.024>
58. D'Abrosca B, Fiorentino A, Izzo A, Cefarelli G, Pascarella M. Phytotoxicity evaluation of five pharmaceutical pollutants detected in surface water on germination and growth of cultivated and spontaneous plants. *J Environ Sci Heal*. 2008;
59. Liu F, Ying G-G, Tao R, Zhao J-L, Yang J-F, Zhao L-F. Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environ Pollut* [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;157(5):1636–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2008.12.021>
60. Iori V, Zacchini M, Pietrini F. Growth, physiological response and phytoremoval capability of two willow clones exposed to ibuprofen under hydroponic culture. *J Hazard Mater*. 2013;262:796–804.
61. Eggen T, Heimstad ES, Stuanes AO, Norli HR. Uptake and translocation of organophosphates and other emerging contaminants in food and forage crops. *Environ Sci Pollut Res*. 2013;20:4520–31.
62. Wu C, Spongberg AL, Witter JD, Sridhar BBM. Transfer of wastewater associated pharmaceuticals and personal care products to crop plants from biosolids treated soil. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. Elsevier; 2012;85:104–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.08.007>
63. Sabourin L, Duenk P, Bonte-Gelok S, Payne M, Lapen DR, Topp E. Uptake of pharmaceuticals, hormones and parabens into vegetables grown in soil fertilized with municipal biosolids. *Sci Total Environ* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;431:233–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.017>
64. Redshaw CH, Wootton VG, Rowland SJ. Uptake of the pharmaceutical Fluoxetine Hydrochloride from growth medium by Brassicaceae. *Phytochemistry* [Internet]. Elsevier Ltd; 2008;69(13):2510–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.06.018>
65. Herklotz PA, Gurung P, Heuvel B Vanden, Kinney CA. Uptake of human pharmaceuticals by plants grown under hydroponic conditions. *Chemosphere*. 2010;78(11):1416–21.
66. Eggen T, Asp T, Grave K, Hormazabal V. Uptake and translocation of metformin, ciprofloxacin and narasin in forage- and crop plants. *Chemosphere*. 2011;85(1):26–33.
67. Shenker M, Harush D, Ben-Ari J, Chefetz B. Uptake of carbamazepine by cucumber plants - A case study related to irrigation with reclaimed wastewater. *Chemosphere* [Internet].

- Elsevier Ltd; 2011;82(6):905–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.052>
68. Boxall AB a, Johnson P, Smith EJ, Sinclair CJ, Stutt E, Levy LS. Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *J Agric Food Chem*. 2006;54(3):2288–97.
 69. Dolliver H, Kumar K, Gupta S. Sulfamethazine Uptake by Plants from Manure-Amended Soil. *Environ Qual*. 2007;36(4):1224–30.
 70. Winker M, Clemens J, Reich M, Gulyas H, Otterpohl R. Ryegrass uptake of carbamazepine and ibuprofen applied by urine fertilization. *Sci Total Environ* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010;408(8):1902–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.01.028>
 71. Calderón-Preciado D, Matamoros V, Bayona JM. Occurrence and potential crop uptake of emerging contaminants and related compounds in an agricultural irrigation network. *Sci Total Environ* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;412-413:14–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.09.057>
 72. Nipa MN, Mazumdar M, Hasan MM, Fakruddin M, Islam S. Prevalence of multi drug resistant bacteria on raw salad vegetables sold in major markets of Chittagong City, Bangladesh. *Middle-East J Sci Res*. 2011;10(1):70–7.
 73. Malchi T, Maor Y, Tadmor G, Shenker M, Chefetz B. Irrigation of root vegetables with treated wastewater: evaluating uptake of pharmaceuticals and the associated human health risks. *Environ Sci Technol* [Internet]. 2014;48:9325–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25026038>
 74. Wu X, Conkle JL, Ernst F, Gan J. Treated Wastewater Irrigation: Uptake of Pharmaceutical and Personal Care Products by Common Vegetables under Field Conditions. *Environ Sci Technol*. 2014;48(19):11286–93.
 75. Ryšlavá H, Pomeislová A, Pšondrová Š, Hýsková V, Smrček S. Phytoremediation of carbamazepine and its metabolite 10,11-epoxycarbamazepine by C3 and C4 plants. *Environ Sci Pollut Res* [Internet]. 2015; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-015-5190-3>
 76. Prosser RS, Lissemore L, Topp E, Sibley PK. Bioaccumulation of triclosan and triclocarban in plants grown in soils amended with municipal dewatered biosolids. *Environ Toxicol Chem*. 2014;33(5):975–84.
 77. Stevens KJ, Kim S-Y, Adhikari S, Vadapalli V, Venables BJ. Effects of triclosan on seed germination and seedling development of three wetland plants: *Sesbania herbacea*, *Eclipta prostrata*, and *Bidens frondosa*. *Environ Toxicol Chem*. 2009;28(12):2598–609.
 78. Wu X, Dodgen LK, Conkle JL, Gan J. Plant uptake of pharmaceutical and personal care products from recycled water and biosolids : a review. *Sci Total Environ* [Internet].



- Elsevier B.V.; 2015;536:655–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.129>
79. Macherius A, Eggen T, Lorenz WG, Reemtsma T. Uptake of Galaxolide, Tonalide, and Triclosan by Carrot, Barley, and Meadow Fescue Plants. *Agric Food Chem.* 2012;60(32):7785–91.
80. Sun H, Wang L, Zhou Q. Effects of bisphenol A on growth and nitrogen nutrition of roots of soybean seedlings. *Environ Toxicol Chem.* 2013;32(1):174–80.
81. Shore LS, Kapulnik Y, Ben-dor B, Fridman Y, Wininger S, Shemesh M. Effects of estrone and 17 β estradiol on vegetative growth of *Medicago sativa*. *Physiol Plant.* 1992;84:217–22.
82. Erdal S, Dumlupinar R. Mammalian sex hormones stimulate antioxidant system and enhance growth of chickpea plants. *Acta Physiol Plant.* 2011;33:1011–7.
83. Guan M, Roddick JG. Comparison of the effects of epibrassinolide and steroidal estrogens on adventitious root growth and early shoot development in mung bean cuttings. *Physiol Plant.* 1988;73(3):426–31.
84. Calderón-Preciado D, Matamoros V, Biel C, Save R, Bayona JM. Foliar sorption of emerging and priority contaminants under controlled conditions. *J Hazard Mater* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;260:176–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.05.016>
85. Rajapaksha AU, Vithanage M, Lim JE, Ahmed MBM, Zhang M, Lee SS, et al. Invasive plant-derived biochar inhibits sulfamethazine uptake by lettuce in soil. *Chemosphere* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;111:500–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.04.040>
86. Tan X, Liu Y, Zeng G, Wang X, Hu X, Gu Y, et al. Application of biochar for the removal of pollutants from aqueous solutions. *Chemosphere* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;125:70–85. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653514015008>
87. Janus A, Perlfrene A, Heymans S, Deboffe C. Elaboration , characteristics and advantages of biochars for the management of contaminated soils with a specific overview on *Miscanthus* biochars. *Environ Manage.* 2015;162:275–89.
88. Essandoh M, Kunwar B, Pittman CU, Mohan D, Mlsna T. Sorptive removal of salicylic acid and ibuprofen from aqueous solutions using pine wood fast pyrolysis biochar. *Chem Eng J* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;265:219–27. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1385894714016167>

89. Rajapaksha AU, Vithanage M, Zhang M, Ahmad M, Mohan D, Chang SX, et al. Pyrolysis condition affected sulfamethazine sorption by tea waste biochars. *Bioresour Technol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;166:303–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.029>
90. Vithanage M, Rajapaksha AU, Tang X, Thiele-Bruhn S, Kim KH, Lee SE, et al. Sorption and transport of sulfamethazine in agricultural soils amended with invasive-plant-derived biochar. *J Environ Manage* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;141:95–103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.02.030>
91. Denyes MJ, Rutter A, Zeeb B a. In situ application of activated carbon and biochar to PCB-contaminated soil and the effects of mixing regime. *Environ Pollut* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;182:201–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.07.016>
92. Foyer CH, Noctor G. Oxygen Processing in Photosynthesis: Regulation and Signalling. *New Phytol*. 2000;146:359–88.
93. Dat J, Inze D, Van Breusegem F. Catalase-deficient tobacco plants: tools for in planta studies on the role of hydrogen peroxide. *Biochem Mol Biol*. 2001;6(1):37–42.
94. Pastori GM, Foyer CH. Common Components, Networks, and Pathways of Cross-Tolerance to Stress . The Central Role of “ Redox ” and Absciscic Acid-Mediated Controls. *Plant Physiol*. 2002;129:460–8.
95. Willekens H, Inzé D, Van Montagu M, van Camp W. Catalases in plants. *Mol Breed*. 1995;1(3):207–28.
96. Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, Vanderauwera S, Van Breusegem F, Noctor G. Catalase function in plants: A focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *J Exp Bot*. 2010;61(15):4197–220.



ANEX 1. Resultats de l'ANOVA del tractament estadístic

- Pes fresc de les fulles

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)			
X	3	5070	1690.0	2.884	0.0705 .			
Residuals	15	8789	585.9					
Signif. codes:	0	***	0.001	**	0.01 *	0.05 '.'	0.1 ' '	1

- Pes sec de les fulles

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)		
X	3	32.77	10.924	11.37	0.00038 ***		
Residuals	15	14.42	0.961				
Signif. codes:	0	***	0.001	**	0.01 *	0.05 .	0.1 ' ' 1

- Pes sec arrels

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
X	3	0.9922	0.3307	7.383	0.00289 **
Residuals	15	0.6720	0.0448		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

- Clorofil·la A

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
X	3	4.016e-05	1.338e-05	5.936	0.00707 **
Residuals	15	3.382e-05	2.255e-06		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

- Clorofil·la B

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
X	3	3.401e-06	1.134e-06	5.905	0.00721 **
Residuals	15	2.880e-06	1.920e-07		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

- Clorofil·les totals

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
X	3	6.601e-05	2.200e-05	5.917	0.00715 **
Residuals	15	5.578e-05	3.719e-06		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1